التحليل الحقلي والمعملي
في
الإنتاج الحيواني

تأليف

د. عبد الحميد محمد عبد الحميد

أستاذ تغذية الحيوان

كلية الزراعة / جامعة المنصورة

دكتوراة من جامعتي الطب البيطري والزراعة بفيينا

حائز على جائزة الدولة التشجيعية عام ١٩٩٠



دار النشر للجامعات

صندوق بريد ١٣٠ محمد فريد - القاهرة

ت : ٣٩٣١٤٣٤ - تليفاكس : ٣٩١٢٢٠٩

الطبعة الأولى

١٤١٧ هـ ـ ١٩٩٦م

رقم الإيداع ١١٣١٨ / ٩٦
I.S.B.N.
977 - 5526 - 47 - 7

دار النشر للجامعات
١٦ شارع عدلى ـ القاهرة

التحليل الحقلي والعملي
في
الإنتاج الحيواني

إهداء

إلى كل مخلص ومحب ...

إلى كل مؤمن ومجد ...

إلى كل من لايعرف الحقد ...

إلى كل من لايعرف الحسد ...

مقدمة

يتطلب البحث فى مجال الإنتاج الحيوانى ومراقبة الجودة إلى تحليل اللحوم ومنتجاتها ، والألبان ومنتجاتها ، والأسماك ومنتجاتها ، وغيرها من السلع الغذائية ، بل قد يضطر إلى تقييم مواد العلف وتحليلها كيماوياً وبيولوجيا ، مما يحتاج إلى استخدام حيوانات تجارب لتقييم هذه الأعلاف ، ومعرفة آثار محتوياتها على الحيوان ومنتجاته ، والتى قد تضر بالإنسان المستهلك لمنتجات الحيوانات .

وفى هذه التجارب البيولوجية يحتاج الباحث إلى تحليل لبن وبيض ودم وبول وروث وسائل كرش هذه الحيوانات التجريبية ، بل يحتاج الباحث كذلك إلى تحليل المياه ، سواء ماء الشرب ، أو ماء تربية الأسماك كوسط لمعيشته .

وعلى ذلك فالتحاليل المتطلبة متنوعة ، ومتشتتة المصادر والطرق ، مما يجهد الباحث فى تجميعها من مصادرها المختلفة ؛ لذا وجدت أنّ وضع هذه الطرق فى مؤلف واحد وباللغة العربية ، فيه استكمال لنقص وعوز فى هذا الفرع فى مكتباتنا العربية .

وقد رأيت اختيار أدق الطرق ، وأسهلها أداء طبقاً لإجراءاتها ، أو وفرة الأجهزة والكيماويات اللازمة لإجرائها ، والتى قمت شخصياً بإجراء الكثير منها ، ولا غنى لأى معمل تحاليل عنها .

وأسأل المولى سبحانه وتعالى أن ينفعنى بهذا العمل ، عملاً بقول أبى الأسود الدؤلى :

ياجامع العلم نعم الذخر تجمعه   لا تعدلن به دراً ولا ذهبا

كما أرجو أن يفيد منه كل طالب علم وباحث فى هذا المجال ، من الزراعيين والبيطريين والأطباء البشريين والصيادلة والعاملين فى معامل الصحة والأغذية والأعلاف ومزارع الأسماك ، من الناطقين بالضاد .

المنصورة : أبريل ١٩٩٤م   المؤلف



الباب الأول

تمهيد

الفصل الأول

احتياطات أمن معملية

كثيراً ما يقف الباحث أو الطالب أو محضر المعمل فى المعمل دون سابق خبرة بأوليات ومبادئ وشروط العمل بالمعمل ، ولا يجيد هذه الأسس إلا بعد التعرض لخطر ما بالمعمل ، أو بعد خبرة سنوات عمل طويلة ، قد يكون لحق به خلالها أضرار مهنية ؛ لذا وجب التنويه فى بداية هذا المؤلف عن الاحتياطات الواجب مراعاتها عند العمل بالمعمل (الذى ينبغى أن تفتح أبوابه للخارج لسهولة النجاة ، وأن تكون أرضياته غير منفذة للسوائل وسهلة التنظيف وقابلة للتوصيل الإلكتروستاتى ، وأن تصنع مناضده من مواد غير منفذة للسوائل وصعبة الاحتراق ومقاومة للكيماويات) ، ونوجز هذه الاحتياطات فى النقاط التالية :

١ ـ لا ينبغى استخدام المعرضين للإغماء والغثيان والصداع ، أو ضعاف السمع وذوى المشاكل فى الرؤية للعمل بالمختبرات .

٢ ـ يجب الإلمام بالإسعافات الأولية ، واستدعاء الطبيب مباشرة عند الشعور بدوار أو دوخة أو تقيؤ ، وتنزع الملابس والجوارب الملوثة بمواد سامة أو ملهبة مع غسل الأجزاء الملوثة من الجسم .

٣ ـ عند اشتعال حرائق تغلق صمامات الكهرباء وتبعد المواد المشعة والمنفجرة واسطوانات الغاز وإخلاء المكان لرجال الإطفاء .

٤ ـ يتحتم على كل باحث أن يراعى الدقة المتناهية فى الأداء ، واليقظة التامة فى المعمل ، والحذر الدائم عند ملامسة أو التعامل مع الكيماويات ، والحرص على عدم ملامستها باليد حرصاً على السلامة العامة ، وكذا عدم التلوث بها ، وأيضاً لنقاوة الكيماويات وعدم إتلافها .

٥ ـ كما ينبغى على الباحث حماية ملابسه بارتداء البالطو الأبيض ، مع ضرورة استعمال أدوات الأمن المختلفة حسب طبيعة التقديرات وتخصص المعمل ، فقد تستلزم بعض المعامل المتخصصة أو التقديرات المعينة أن يستعمل الباحث قفازات خاصة (بلاستك أو مطاط أو نيتريك أو فينيل أو تفلون أو قطن أو سوليفان أو عازلة للحرارة) ، أو كمامات أو نظارات مانعة لنفاذ أشعة أو ضوء معين أو عند فتح دوارق بها مادة خطرة ، أو دروع لوقاية الوجه ، أو غطاء للرأس .

٦ ـ استعمال القفازات المضادة للحرارة عند إدخال أو استخراج أدوات من الأفران ، مع استعمال المواسك الخاصة بأفران الحريق ، والمواسك الأخرى عند تداول أشياء ستتعرض

للحرارة .

٧ ـ ضرورة التأكد من ملاءمة التيار الكهربى بالمعمل للأجهزة الكهربية من حيث شدة التيار ، وكذا مقاومة الأسلاك الكهربية بالمعمل وملاءمتها لحمل الأجهزة ، مع توزيع الأجهزة على عدة وصلات ، كى يتوزع الحمل الكهربى ، ونضمن سلامة واستمرار الأداء ، مع وجود منظم للتيار للحرص على الأجهزة ، وتكون المفاتيح بعيدة عن الأحواض.

٨ ـ وجود أنابيب إطفاء حريق بالمعمل ، وأن تكون عبواتها فعّالة ، مع وجود بعض وسائل الإسعافات الأولية من مراهم حريق ، ومحلول بوريك وشاش معقم ورشاشات مائية لإطفاء الملابس وخلافه للطوارئ المعملية ، بجانب صنابير المياه الخاصة بغسيل العينين.

٩ ـ مراعاة أن تكون التهوية جيدة بالمعمل ، وكذا الإضاءة تكون مناسبة للرؤية السليمة، ولنوع التحاليل (قد تتطلب بعض التحاليل إظلام فتزود المعامل بستائر) .

١٠ـ ترتيب أماكن العمل ، وعدم كثرة الأشياء التى لا يعمل بها فى مكان العمل ، بأن ترفع كل حاجة فى مكانها ، وأن تخصص أماكن سواء دواليب أو أرفف لكل حاجة متجانسة ، مثلاً أرفف للكيماويات المستحضرة ، وأخرى للكيماويات المركزة ، وثالثة للكيماويات المسحوقة ، ورابعة للمذيبات أو للأحماض أو للزجاجيات ، بل قد تفهرس الأماكن مثلاً دواليب بها أحماض على حدة وقواعد على حدة ، أو ترتب أبجديا ، وهكذا حتى يسهل استخراج المطلوب بنظام وبسرعة .

١١ـ يجب أن يتوفر فى المعمل خزانة (دولاب) غازات ، مزودة بمروحة سحب ، وجرار زجاجى للعمل فيه للتفاعلات أو الخطوات المصحوبة بتصاعد أبخرة أو غازات سامة أو مهيجة أو ملهبة ، على أن تدار الصنابير من خارج خزانة الغازات ، وتطلى من الداخل بطلاء مضاد للنار .

١٢ـ يجب أن تتوفر الراحة والأمان فى المعمل ، فمثلا يمكن أن يلبس الباحث حذاء خفيفاً لتهوية أقدامه إن طال العمل بالمعمل ، وأن يزود المعمل بمقاعد مريحة أمام الموازين أو المكاتب أو الأجهزة الأخرى التى يمكن الجلوس أمامها ، كما يجب عدم التدخين بالمعمل ، خاصة إن كان يحوى مواد ملتهبة أو مذيبات عضوية ، كما يجب الحرص بعدم استخدام أطعمة بالمعمل خوفاً من تلوثها .

١٣ـ أدوات المعمل وأجهزته لا تستعمل شخصياً ، فقد يضر مثلاً استخدام ثلاجة المعمل فى حفظ مأكولات ، فقد تكون بها آثار عينات أو كيماويات أو خلافه ، مما يلوث المأكولات بآثار سامة أو مشعة أو كاوية وخلافه ، كذلك لا يستسهل بشرب الماء أو عمل مشروبات فى زجاجيات المعمل لنفس الأسباب .

١٤- عدم العبث بأى جهاز عشوائياً طالما لا حاجة لك به .

١٥- استرشد بذوى الخبرة ممن سبقوك بلا حرج ، بأن تسأل عن طريق استخدام مالا تعرف ، أفضل من أن تجرب بنفسك فتتلفة ؛ لأن الأجهزة المعملية حساسة .

١٦- احذر من استضافة زوار بالمعمل ، فقد يكون مجرد وجودهم خطراً لعبثهم بأجهزة أو بكيماويات ، أو قد يشغلونك عن أداء شيء معين فى توقيته فيتلف ماكنت تؤديه من تحليل ، أو قد يكون منهم من ليس لديه علم أو حساسيه بظروف المعمل فيشعل ناراً أو سيجاراً فى وجود بخار مذيب عضوى مثلاً ، فيتسبب فى حريق .

١٧- نظم عملك دائماً حتى يسهل أداؤك ، وكن نظيفاً حريصاً على نظافة وسلامة المعمل ، فلا تترك آثاراً لحامض أو قلوى أو مذيب على أدراج أو مقاعد ، ولا تلقى بأى شيء على الأرض ؛ بل استعمل سلال المهملات للأوراق والرواسب وخلافه ، والأحواض للسوائل فقط كى تضمن استمرار صرف الأحواض فلا تسدها برواسب أو فضلات عينات أو أوراق أو سجاير أو قطع زجاج ، فاعتبر المعمل جزءاً من منزلك واعتبر أى جهاز بالمعمل كأنه ملك خاص لك فاحرص على ألا تتلفه حتى بعد انتهاء عملك عليه أو به .

١٨- يجب التأكد من سلامة الأجهزة ، وأنها تعمل قبل البدء فى تقديراتك .

١٩- يجب الحرص على تغطية ونظافة الأجهزة ، سواء من الأتربة أو من بقايا العينات .

٢٠- الأجهزة توزع بحرص على أن تكون الموازين فى غرفة بعيدة عن التيارات الهوائية والأتربة ، وعلى أرفف رخام بالحوائط غير متصلة بالأرض ، مع ضبط وضعها الأفقى وبعدها عن مصادر الحرارة كالأفران ، كذلك أجهزة القياس الضوئية الكهربية تكون بعيدة عن الأفران ومزودة بمنظم للتيار الكهربى ، وحدات سوكسلت كذلك تبعد عن مصادر اللهب والأفران ، وحدات الهضم تكون أسفل خزانة الغازات إن لم تكن حديثة كالتى تصرف غازاتها فى البالوعة مباشرة أو تحت محلول شديد القلوية .

٢١- لاحظ تمام نظافة الزجاجيات ، وغسيلها جيداً ، ثم غسيلها بالماء المقطر ، وتجفيفها فى الأفران ، وتعقيمها إن لزم الأمر .

٢٢- ضرورة أن تكون المحاليل المائية باستخدام الماء المقطر ، بل قد تحتاج إلى ماء معاد تقطيره Redistilled كما فى تقديرات المعادن والإنزيمات وخلافه .

٢٣- فى حالة عدم تزويد المعمل بمراوح سحب فتفتح النوافذ للتهوية إذا لزم الأمر .

٢٤- توفير أدوات الكتابة اللازمة للكتابة على الزجاجيات ، سواء أقلام شمع يتحمل حرارة الترميد أو فلوماستر يتحمل التجفيف .

٢٥- قبل البدأ فى استعمال جهاز جديد يجب معايرته ،

فالاسبكتروفوتوميتر Spectrophotometer مثلاً يعين له معامل التصحيح للتأكد من سلامة قياسه على محلول قياسى من البيكرومات مختلف التركيز . نفس الشيء للأجهزة المستعملة الأخرى فيجب تصفير Zeroing بعض الأجهزة مثلاً كالميزان بضبط الوضع الأفقى له ، أو Colorimeter والـ Spectrophotometer باستعمال عينة خاوية blank سواء ماء أو المذيب المستعمل مع العينة ، كذلك يضبط جهاز PH- meter باستخدام محلولين منظمين Buffer Solutions معلومة الحموضة (PH) .

٢٦ـ تثبيت أوزان صوانى الرطوبة وبواتق الترميد ، واستخدام أغطيتها للدقة وعدم تطاير أجزاء من العينة .

٢٧ـ قياس الأوزان بدقة حتى رابع رقم عشرى مع اتباع الطرق التجريبية بكل دقة وعدم الحيدة عنها لمراعاة دقة النتائج .

٢٨ـ لخفض التلوث أثناء الطحن للعينة فلا تطحن فى مطحنة (طاحونة) ، بل تصحن فى هاون أو يستبعد الجزء الأول من العينة أثناء الطحن ، مع تنظيف الطاحونة بين كل عينة وأخرى بفرشة من وبر الجمل .

٢٩ـ تخفيف الأحماض يكون فى أوانى زجاجية تتحمل الحرارة على أن يضاف الحامض إلى الماء وعلى جدار الإناء ، على أن يكون اتجاه فوهة الإناء بعيداً عن الوجه ، والإضافة تدريجية بطيئة .

٣٠ـ تحضير محاليل الصودا الكاوية يكون فى أوانى زجاجية ، تتحمل الحرارة ، ويوضع الماء على الصودا مع التقليب حتى الذوبان .

٣١ـ تجرى التقديرات دائماً مزدوجة duplicate ، فإن كان الفارق بينهما معنويا يجرى تقدير ثالث triplicate ويؤخذ متوسط التقديرات الثلاثة .

٣٢ـ يجرى عمل تجربة خاوية blank بدون عينة ؛ لاستبعاد أى أخطاء فى التقدير ، أو شوائب فى الكيماويات أو خلافه .

٣٣ـ يجب قراءة أسماء المحاليل بدقة ، ومراعاة القوة أو التركيز ؛ لعدم الخلط بين التركيزات مما يؤدى إلى حدوث أخطاء جسيمة .

٣٤ـ يجب التقيد بالمدد الزمنية المنصوص عليها فى خطوات العمل فهذه المدد اتفق عليها بعد خبرة وتجارب عديدة ، وكذلك مدة صلاحية المحاليل سابقة التجهيز .

٣٥ـ قبل بدء العمل تقرأ طريقة العمل بمنتهى الدقة ، فقد توجد خطوات تحتاج إلى وقت كالترسيب لمدة طويلة أو التبريد ، مما يستدعى تصميم التمرين ليتلاءم مع الوقت .

٣٦ـ المعامل المستخدمة فيها النظائر المشعة يجب أن تخضع لرقابة مؤسسة الطاقة الذرية، من حيث مواصفات مبانيها وسمك الجدران ، مع توفير وسائل وعلامات التحذير على

المعامل والأوانى ، والتى يوضح عليها محتوياتها والجرعة التى يمكن التعرض لها ، مع التحكم فى التلوث الداخلى للمعامل والمناضد والزجاجيات والمقاعد والصنابير ؛ لذا ينبغى وجود ضباط أمن إشعاع ، وفحص الأجهزة الشخصية المحذرة للأفراد ، وفحص الأشخاص دورياً ، ورقابة عمليات نقل وتخزين المواد المشعة ومخلفاتها ، ويركب مرشح على فتحات الشفط لتجميع جزيئات الغبار الذرى ، خاصة فى حالة جزيئات الفا ، وتجرى العمليات المعملية على ورق نشاف ، ولإزالة التلوث من الجلد يغسل بالصابون السائل والماء ، ويزال التلوث الإشعاعى من الزجاجات والسطوح بالغسيل بحمض هيدروكلوريك أو نيتريك ١٠ ٪ أو حمض كروميك ٢ ٪ أو ثنائى فلوريد أمونيوم ٢ ٪ وغيرها ، والمخلفات يتم تجميعها وتخزينها حتى ينخفض نشاطها الإشعاعى أو تدفن فى الأرض ، كما لاتستخدم الحيوانات المعاملة بالإشعاع فى تغذية الإنسان بل تقتل بدون إسالة دماء ويتخلص منها بالدفن الأرضى وكذلك مخلفاتها .

٣٧ـ تمسك الأنابيب والزجاجيات عموماً بمواسك منعاً من تلوثها .

٣٨ـ عدم استنشاق أو تذوق أو ملامسة أى مادة كيماوية ، مع ضرورة قراءة التحذيرات على كل عبوة كيماوية .

٣٩ـ عدم النفخ بالفم فى أى مسحوق ، وعدم سحب أى كيماويات بالفم بل تستخدم الماصة الأوتوماتيك أو نصف الآلية ، أو تستخدم مساعدات المواص التى تركب على المواص لسحب المحاليل .

٤٠ـ استخدام الزجاجيات القياسية (المعيارية) الملاءمة من حيث سعاتها لحجم المحاليل المستخدمة ؛ منعاً من إهدار حجم العينة أو بعثرته .

٤١ـ ينبغى عدم سكب مخلفات المعامل الضارة أو السامة فى البالوعات منعاً من تلويث مياه الصرف ، بل ينبغى التخلص منها حسب حالتها وكميتها وإخطار الجهات المسؤولة عن ذلك لإحراقها أو إتلافها بعيداً عن المساكن ، مع توفير الأدوات الخاصة بجمع المخلفات.

٤٢ـ ينبغى الدقة وتأمين تداول عينات معامل الكيمياء الحيوية والكيمياء المرضية Clinical Chemistry ، والتى تحتوى عينات دم أو بول أو روث أو محتويات معدة أو صفراء أو سائل نخاع ، والتى قد تؤدى إلى انتقال الأمراض من المصابين إلى غير المصابين، كما فى إصابة مرضى الفشل الكلوى المزمن (المتطلبون نقل دم باستمرار) بڤيروس التهاب الكبد عن طريق نقل دم ملوث بالڤيروس ، وكذلك مرضى الصفراء قد تحتوى دماؤهم على ڤيروس التهاب الكبد ، كما ينتشر التهاب الكبد بانتقال الڤيروس من عينات بول المرضى المحفوظة فى ثلاجة بها دم أو أكل لمريض آخر .

٤٣ـ دائماً تكتب بيانات الأوانى المختلفة ومحتوياتها وتركيزاتها وموعد تحضيرها أو

إعدادها .

٤٤ــ تجمع الأوانى الزجاجية المكسورة فى صناديق خاصة .

٤٥ــ الحذر من استخدام الكيماويات السامة خاصة المواد المعملية المسببة للسرطان مثل:

كوينو دى فينيل، اسبستس، بنزيدين ، بنزول ، كوبلت ، زرنيخ ، نيكل (ومركباته اللاعضوية) ، إثيلينيمين ، دى إزو ميثان ، ١ ، ١ــ دى ميثيل هيدرازين ، ن ــ دى ميثيل نيتروزامين ، دى ميثيل سلفات ، هيدرازين ، بر يلليوم ، كرومات ، ٢ــ نافثيل أمين ، نيكل كربونيل ، ١ ،٣ــ بروبان سلتوم ، ب ــ بريو لاكتون ، بروبيلينيمين .

لذا أوصى بعدم تخطى التركيزات القصوى المسموح بتواجدها فى المختبرات فى صورة غازية أو بخارية فى الهواء ولا تسبب ضرراً بالصحة وفقاً للمعلومات المتوفرة حالياً وعند العمل لمدة ٨ ساعات يومياً والتى يلخصها الجدول التالى :

المركب	الحـد الأقصى	
	جزء في المليون	مجم / م^{٣}
اسيتا لدهيد	٢٠٠	٣٦٠
أسيتون	١٠٠٠	٢٤٠٠
أسيتو نيتريل	٤٠	٧٠
الدرين		٢٥ , .(يمتصه الجلد)
أمونيا	٥٠	٣٥
كحول إميل	١٠٠	٣٦٠
أنيلين	٥	١٩ (يمتصه الجلد)
أنتيموني		٠,٥
بورون أكسيد		١٥
بورون تراي فلوريد	١	٣
بروم	٠,١	٠,٧
بروميد هيدروچين	٥	١٧
بيوتان	١٠٠٠	٢٣٥٠
بيوتانول	١٠٠	٣٠٠
كادميوم أكسيد		٠,١

المركب	الحد الأقصى	
	جزء فى المليون	مجم / م٣
كلوريناتد بيفينيل	٠,١	١ (يمتصه الجلد)
كلور فورم	٥٠	٢٤٠
كلوريد ترى فلوريد	٠,١	٠,٤
كلوريد هيدروچين	٥	٧
حامض كروميك		٠,١ (يسبب حساسية)
سيانيد		٥ (يمتصه الجلد)
سيكلو هكسان	٣٠٠	١٠٥٠
سيكلو هكسانول	٥٠	٢٠٠
كوبلت		٠,٥
ك أ ٢	٥٠٠٠	٩٠٠٠
ك أ	٥٠	٥٥
نحاس (دخان)		٠,١
نحاس (غبار)		١
د د ت		١ (يمتصه الجلد)
دي إيثيل إمين	٢٥	٧٥
دي كلور وايثان	٢٠	٨٠
دى كلوروميثان	٥٠٠	١٧٥٠
حمض خليك		١٠
ديلدرين		٠,٢٥ (يمتصه الجلد)
كالسيوم أكسيد		٥
كافور	٠,٣	٢
كلور	٠,٥	١,٥

المركب	الحد الأقصى	
	جزء في المليون	مجم / م^3
دي ميثيل أمين	١٠	١٨
دي ميثيل هيدرازين	٠,٥	١ (يمتصه الجلد ويسبب حساسية)
دي نيترو بنزين	٠,١٥	١ (يمتصه الجلد)
اندرين		٠,١ (يمتصه الجلد)
إيثير	٤٠٠	١٢٠٠
إيثيل امين	١٠	١٨
فلور	٠,١	٠,٢
فلوريد هيدروجين	٣	٢
فور مالد هيد	١	١,٢ (يسبب حساسية)
حمض فورميك	٥	٩
هيدرازين	٠,١	٠,١٣ (يمتصه الجلد ويسبب حساسية)
هيدروكينون		٢
يود	٠,١	١
مالاثيون		١٥ (يمتصه الجلد)
منجنيز		٥
ميثانول	٢٠٠	٢٦٠ (يمتصه الجلد)
ميثيل أمين	١٠	١٢

المركب	الحد الأقصى	
	جزء في المليون	مجم / م٣
ميثيل بروميد	٢٠	٨٠ (يمتصه الجلد)
ميثيل كلوريد	٥٠	١٠٥
نيكوتين	٠,٠٧	٠,٥ (يمتصه الجلد)
نيترو بنزين	١	٥ (يمتصه الجلد)
نيترو جليسرول	٠,٥	٥
رصاص		٠,٢
زئبق	٠,٠١	٠,١
أوزون	٠,١	٠,٢
باراثيون		٠,١ (يمتصه الجلد)
فينول	٥	١٩ (يمتصه الجلد)
فوسفور (أصفر)	صفر	٠,١
فوسفيد هيدروچين	٠,١	٠,١٥
حمض بكريك		٠,١
بلاتين		٠,٠٠٢
بروبان	١٠٠٠	١٨٠٠
كحول بروبيل	٤٠٠	٩٨٠
بيريدين	٥	١٥
كوارتز		٠,١٥
كوينون	٠,١	٠,٤
كب أ٢	٥	١٣

المركب	الحـد الأقصى	
	جزء فى المليون	مجم / م^{٣}
يد٢ كب أ٤		١
يد٢ كب	١٠	١٥
سيلنيوم		٠,١
فضة		٠,٠٥
رابع كلوريد كربون	١٠	٦٥ (يمتصه الجلد)
تولوين	٢٠٠	٧٥٠
تولويدين	٥	٢٢ (يمتصه الجلد)
ڤانا ديوم (دخان)		٠,١
ڤانا ديوم (غبار)		٠,٥
قصدير (مركبات لاعضوية)		٢
قصدير (مركبات عضوية)		٠,١ (يمتصه الجلد)
زركون		٥
حمض خليك	٢٥	٦٥
خليك انهيدريد	٥	٢٠
حمض نيتريك	١٠	٢٥
ثاني أكسيد النتروجين	٥	٩

ولمزيد من المعلومات يرجع إلى المرجع :

مثنى عبد الجبار شنشل (١٩٨٣) : توجيهات العمل بالمختبرات الكيماوية (تعريب من الأصل الألمانى ـ طبعة ١٩٦١م عن الاتحاد الرئيسى لتعاونيات الحرف الصناعية ـ بون). جامعة بغداد .

الفصل الثاني
بعض الأجهزة والأدوات المعملية
وأسس استخدامها

فيما يلي عرض مبسط لبعض الأجهزة والأدوات المعملية مع الإشارة إلى الأسس النظرية والعملية لاستخدامها .

١ـ الميزان Balance :

الاستعمال الصحيح للميزان هو الوسيلة الأكيدة للوزن الدقيق ، ولتحقيق ذلك يلزم اتباع الآتي :

١ ـ تخصص حجرة للموازين بعيدة عن التيارات الهوائية ، أو على الأقل في المعمل بعيدة عن الشبابيك أو الأبواب أو الأفران ، وعلى ألا توضع على منضدة بل على رف رخام مثبت في الحائط لتلافي أثر الاهتزازات والذبذبات الأرضية .

٢ ـ تنظيف الميزان قبل وبعد استعماله بفرشاة خاصة لإزالة الأتربة أو بقايا العينات المتناثرة .

٣ ـ غطاء الميزان بعد استعماله لإبعاده عن الأتربة .

٤ ـ ضبط الوضع الأفقي للميزان بالميزان المائي .

٥ ـ ضبط نقطة الصفر للميزان (الذي لا يضبط أتوماتيكياً أي ذاتياً) .

٦ ـ بعد ضبط الميزان وتنظيفه يقفل بابه (أو أبوابه) باستمرار أثناء الوزن .

٧ ـ الموازين ذات الصنج لا تمسك صنجها باليد ، بل بالماسك الخاص ، تلافياً لأثر اليد الملوثة بالأتربة والعرق والدهون .

٨ ـ عدم الوزن والأواني أو العينة ساخنة أو حتى دافئة .

٩ ـ إدارة مفاتيح الميزان (سواء للضبط أو للوزن) بلطف حتى لا تتآكل المناشير التي يرتكز عليها القب أو الروافع .

١٠ـ يدون الوزن حسب الدقة المطلوبة ، أو حسب أهمية الأرقام ، وعادة تدون لرابع رقم عشري .

١١ـ الوزن بسرعة قدر الإمكان كي لا تتغير الوزنة بتراكم الرطوبة الجوية عليها .

١٢ـ حمولة ودقة الميزان ونسبة الخطأ فيه تتوقف على نوع الميزان وحساسيته .

وقد شملت التكنولوچيا العصرية كذلك الموازين ، وأصبح الميزان ذو القب والكفتان تقريباً غير مستعمل ؛ لانتشار الموازين الكهربائية ذات الحمولات والحساسيات المختلفة ، حتى أصبح أوتوماتيكياً كاملاً فتضع العينة يظهر الوزن مباشرة (أو بمجرد الضغط على زر) في ظرف ٢ثانية، بل لقد أمكن تركيب أجهزة تجفيف (تعمل بالأشعة تحت الحمراء) على بعض الموديلات من الموازين ليعمل كميزان وفرن تجفيف ، فيقدر المحتوى المائي أو الوزن الجاف والفقد في الوزن في زمن قدره ٤–١٥ دقيقة .

وقمة التطور في استخدام الموازين تظهر في المصانع المختلفة إذ تتصل بكومبيوترات لتسجيل الأوزان وحفظها ، أو تتصل بمستودعات وسيور متحركة وأجهزة طبع بيانات وتغليف ، كما في مصانع الجبن والمعلبات والمجازر ومصانع الأعلاف وغيرها كثيراً .

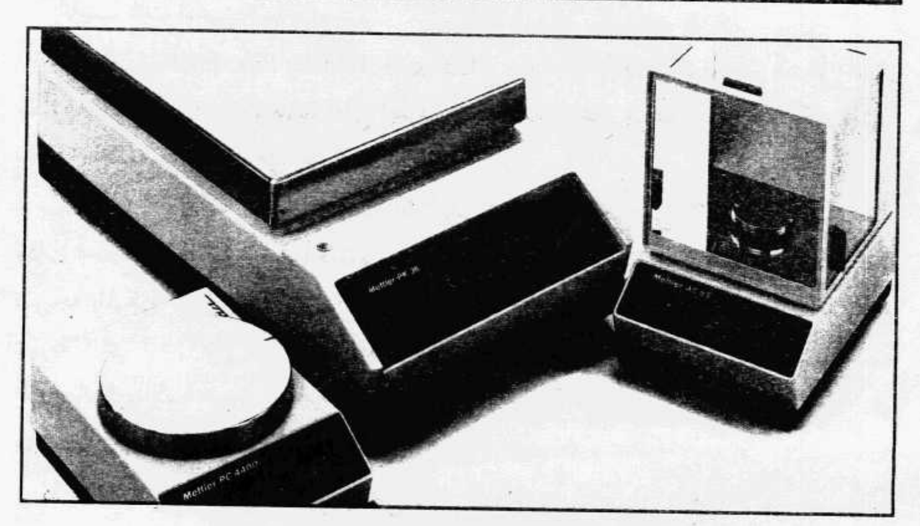
وهناك موازين دقيقة Micro Balance قد يكون حدها الأقصى ٢٥جم أو حتى ٣جم ، إلا أنه هناك موازين أقل دقة وحد الوزن الأقصى عليها ١٠٠٠جم أو حتى ٣٠كيلو ، ولا يجب وضع الأجسام التي ستوزن على الكفة مباشرة إلا إذا كانت معدنية أو زجاجية أو صينية ، أما ما دون ذلك فتوضع في زجاجة ساعة أو طبق ، كما يجب أن تكون درجة حرارة الأجسام الموزونه مساوية لدرجة حرارة الغرفة فإذا زادت حرارتها تواجد تيار هواء من أسفل لأعلى حول الكفة ويقل وزنها عن الحقيقة ، والعكس عندما تكون حرارتها منخفضة، إضافة الأوزان الأكبر أولاً، إضافة الأوزان والقب ثابت إذا كانت الأوزان أكبر من ١,٠جم.

وتتصل الموازين الآن فى المعامل بغيرها من الأجهزة لتتم عدة عمليات معملية فى آن واحد فبجانب الوزن يجرى التجفيف أو التقليب أو المعايرة أو الحساب والعد وخلافها .

ومن أشهر شركات الموازين فى العالم شركة Mettler الدولية الانتشار ، ومقرها بزيورخ بسويسرا وفروعها بألمانيا وهولندا والولايات المتحدة ، وكذلك شركة Sartorius الألمانية الغربية، وفروعها فى هولندا وفرنسا والنمسا والمملكة المتحدة والولايات المتحدة .

وتتوقف دقة الميزان على حمولته ، وفيما يلى أمثلة لذلك (بما فيها الموازين فوق الدقيقة) :

حمولة الميزان بالجرام	حساسيته (دقته)	معدل الخطأ في القراءة
٣	٠,١–١ ميكرو جرام	± ٠,١ إلى ١ ميكرو جرام
٤,١	١ ميكرو جرام	± ١ ميكرو جرام
٢٥	١–١٠ ميكرو جرام	± ١ إلى ١٠ ميكرو جرام
٣٠	١ ميكرو جرام	± ٠,٠٠١ مجم
٨٠	٠,١ مجم	± ٠,٠٠٠١ مجم
١٦٠	١٠–١٠٠٠ ميكرو جرام	± ٥٠–٥٠٠ ميكرو جرام
٢٠٠	٠,١–١٠ مجم	± ٠,٠٥ مجم إلى ± ١٠ مجم
٤٠٠	١ مجم	± ١ مجم
١٠٠٠	٠,٠١ جم إلى ٠,١ جم	± ٥ إلى ١٠٠ مجم
٢٠٠٠	٠,١ جم	± ١٠٠ مجم
٣٠٠٠	٠,٠١ جم	± ١٠ مجم
٤٠٠٠	٠,١ جم	± ٥٠ مجم
٥٠٠٠	٠,١ جم	± ٥٠ مجم
٦٠٠٠	٠,٥ جم	± ٢٥٠ مجم
٧٠٠٠	٠,١ جم	± ١٠٠ مجم
١٠٠٠٠	١ جم	± ٠,٥ جم
١٥٠٠٠	١ جم	± ٠,٥ جم
٣٠٠٠٠	١ جم	± ٠,٥ جم



(شكل ١) نماذج لموازين مختلفة الحمولة والدقة (٠,١جم - ١, مجم)

وهناك موازين تقرأ حتى حساسية خامس رقم عشرى من الجرام ($\times 10^{-5}$جم) أى ١٠ ميكرو جرام .

٢ ـ الدورق المعياري Volumetric Flask :

هو أحد الأوانى القياسية Measuring Vessels ذو قاعدة مستوية ، طويل العنق ، مدون على جسمه بيان بالحجم الذي يسعه الدورق حتى العلامة التي على عنقه إن وجدت ، وذلك في درجة حرارة معينة ، وتختلف حجوم الدوارق المعيارية من ١٠ ملليلتر إلى ٥ لتر وقد يكون لها غطاء .

ولاستعمال الدورق المعيارى لتحضير تركيز معين من محلول ما ، تذاب المادة الموزونة أولاً فى كأس أو زجاجة ساعة ، ثم تنقل كميا بالمذيب المستخدم إلى الدورق حتى قبل العلامة التي على العنق بمسافة ٢-٣سم^{3} ، ثم يكمل حتى العلامة بالمذيب باستخدام ماصة لتلافى الزيادة فى حجم المحلول عن علامة الدورق ، ثم يرج جيداً بعد سده بالغطاء الخاص . ومنه الزجاجي القياسى ومنه البلاستك .

٣ ـ المخبار المدرج Measuring Cylinder :

أنبوبة زجاجية أو بلاستيكية واسعة مدرجة ذات قاعدة زجاجية سميكة ، ويستخدم فى أخذ الحجوم التقريبية أو حفظها وتختلف حجوم المخابير من ٥سم^{3} إلى ٢لتر ، ومنها ماله فوهة ضيقة ذات سدادة ومنها مدرجا ؛ ودقة المخبار تنحصر ما بين ٠,١ إلى ٢٠,٠مل ، ومعامل الخطأ فى القراءة ينحصر ما بين ٠,١-٢٠,٠مل كذلك .

٤ ـ الماصة Pipette :

أنابيب ذات نوعين هما :

أ ـ ماصة ناقلة Transfer Pipette ذات انتفاخ ، مدون عليها بيان بحجم السائل الذي يملؤها حتى العلامة الموجودة على الطرف غير المدبب عند درجة حرارة معينة ، ومنها سعات مختلفة تبدأ من ١مل إلى ١٠٠مل .

ب ـ ماصة قياسية Measuring Pipette ذات تدريج خارجي من القمة إلى القاعدة ، وذات أحجام مختلفة لأخذ أحجام مختلفة من المحاليل حسب الرغبة ، ومنها ما يكون تدريجه بالميكرو لتر أو بالملليلتر أي تبدأ سعتها من ١٠ ميكرو لتر (وتسمى بالماصة الميكرو لترية) أي ٠,٠١مل إلى ٢٥مل بدقة قياس ٠,٠٠٠١-٠,١مل . وهناك الماصة الأوتوماتيك ذات الحجوم المتغايرة الميكروليترية أو الملليلترية .

ملاحظات على استخدام الماصة :

١ ـ لا يفضل سحب المحاليل بالمص ، بل تستخدم مساعدات الماصة (من مضخات

كاوتشوك ماصة كابسة) التي تركب على الطرف الغير مدبب للماصة أو تستخدم الماصات النصف أوتوماتك أو الأوتوماتك .

٢ ـ عدم استعمال الفم في ملء الماصة بالمحاليل السامة أو الملتهبة أو الكاوية .

٣ ـ لا يستعمل الشفط القوي Vigorous Sucking لتلافي تكوين الفقاعات الهوائية ، وعدم النفخ لتلافي دخول اللعاب .

٤ ـ عند تفريغ الماصة لابد من وضعها في وضع مائل ، حتى ينزل المحلول منها بسرعة معقولة ، على أن يلامس طرفها المدبب لجدار الوعاء الداخلي .

٥ ـ عند ملء الماصة تملأ أولاً لأعلى من التدريج أو العلامة العلوية بقليل ، ثم تسد الفتحة العليا (في حالة عدم استخدام مساعدات الماصة) بالسبابة مع مسك الماصة بالإبهام والوسطى ، ثم يجفف الطرف السفلي من الخارج بقماش أو ورق ترشيح ، ويحرك السبابة ببطء ، واحترس حتى ينزل المحلول للعلامة . تحفظ الماصة عند عدم استعمالها بعد غسيلها في وضع أفقي كي لا يخدش طرفها .

٦ ـ الماصة تعطي الحجم المدون عليها مع مراعاة عدم تفريغ النقطة الأخيرة بالنفخ .

٧ ـ لابد من أن يكون السبابة الذي يسد الماصة جاف حتى يمكن التحكم في ضبط حجم المحلول بالماصة بتحريك السبابة ببطء للأمام والخلف (أو إلى الجانبين أحياناً ـ إن كانت السبابة مبتلة ـ أو دوران الماصة تحت السبابة) .

٨ ـ قبل استعمال الماصة تغسل بالماء العادي ثم بالماء المقطر ثم بالمحلول المراد استخدامه، ويقرأ الحجم عند الخط الماس للسطح المقعر من السائل عديم اللون (أو الخط الماس للسطح العلوي من السائل الملون) مع أخذ القراءة والماصة في مستوى أفقي مع النظر . كسر الطرف المدبب للماصة يفقدها تمام التحكم في إنزال حجم معين منها .

٩ ـ معامل الخطأ في قراءة الماصة ما بين ± ٠,٠٠٢ و ± ٠,١ مل .

٥ ـ السحاحة Burette :

أنبوبة مدرجة من القمة إلى القاعدة ، مع وجود اختناق في القاعدة وتنتهي بصنبور زجاجي أو خرطوم كاوتشوك بمحبس ، ومنها أحجام مختلفة من ١-١٠٠ مل ، مع تقسيم كل مل إلى عشرة أقسام كل منها ٠,٠١-٠,٢ مل حسب الحجم الكلي .

ملاحظات على استعمال السحاحة :

١ ـ تحفظ السحاحة في وضع رأسي عند استخدامها .

٢ ـ تملأ بواسطة قمع صغير إلى ما فوق أعلى التدريج بقليل ، ثم يفتح الصنبور لطرد فقاعات الهواء أسفل الصنبور ، على أن يكون الجزء التالي للصنبور مملوءاً تماماً بالمحلول ،

ثم يفتح الصنبور تدريجياً لضبط سطح المحلول عند التدريج العلوي بالضبط .

٣ ـ ينزع القمع مباشرة عقب ملء السحاحة – أي لا يعاير في وجود القمع – أو يضبط حجم المحلول بالسحاحة في وجود القمع .

٤ ـ تمسح السحاحة ويقرأ حجم المحلول بها ، كما سبق ذكره في الماصة .

٥ ـ يراعى عدم وجود أي تنقيط من صنبور السحاحة قبل استعمالها .

٦ ـ في حالة وجود فقاعة هواء عند وصلة الكاوتشوك يثنى الجزء الكاوتشوكي إلى أعلى ، مع السماح للسائل بالنزول والخرطوم مرفوع لأعلى فيساعد على خروج الفقاعة .

٧ ـ هناك سحاحة أوتوماتيكية يمكن ملؤها أولاً بأول عند إفراغها لاتصالها بخزان مليء بالمحلول ، وهذا في حالة استعمالها لمحلول معين دوما .

٨ ـ بعد انتهاء العمل بالسحاحة وغسيلها جيداً توضع مقلوبة على حاملها ؛ لتلافي تسريب سطحها الداخلي . معامل الخطأ لقراءة السحاحة يقع ما بين ± ٠,٠١ إلى ±١٥ ,مل.

٦ ـ الدورق المخروطي Conical Flask :

دورق مخروطي الشكل ومنه أحجام مختلفة من ٢٥ مل إلى ٥ لتر ، ومنه ماهو مدرج لأحجام بينية ، ومنه ما له سدادة مصنفرة (غطاء) ، وهو يغسل بالماء العادي ثم الماء المقطر ولا يغسل بالمحلول الذي سيوضع به كي لا يتأثر حجم المحلول إذا ما استخدم في المعايرة .

٧ ـ المجفف Desiccator :

يستعمل في حفظ الأدوات المستخدمة في الوزن ، وكذلك في حفظ العينات وخلافها، ثابتة الوزن ، ويبعدها عن الرطوبة الجوية التي تغلف كل شيء في الجو ، وتختلف من وقت لآخر ومن مكان لآخر ، فتختلف بالتالي الأوزان لهذه الأشياء من وقت لآخر ، مالم تكن محفوظة في المجفف . والمجفف حيز مغلق محكم خال من الرطوبة الجوية لوجود مادة تمتص الرطوبة أولاً بأول توضع بقاع المجفف ، ومن هذه المواد المجففة كلوريد الكالسيوم وهي الأكثر انتشاراً واستخداماً ، كما قد تستعمل كبريتات النحاس أو السليكاجيل .

وتستعمل المجففات كذلك لحفظ الأدوات الخارجة من الأفران لتبرد قبل وزنها بعيداً عن الرطوبة الجوية ، وفي استعمالها للأدوات الساخنة التي تسبب تمدد هواء المجفف فيؤدى ذلك إلى طرد غطاء المجفف ، وإذا ترك المجفف مفتوحاً فترة لتمدد الهواء ثم غلق بعد ذلك ؛ فإن انكماش هواء المجفف نتيجة تبريد الأجسام داخله يؤدي إلى زيادة الضغط الجوي خارج المجفف عن الضغط داخله فيصعب فتح المجفف ، وعند فتحه بشدة يندفع

التيار الهوائي داخل المجفف بقوة مما يسبب تطاير ما قد يكون بالمجفف من عينات فيسبب خطأ كبيراً ، لذلك تستعمل المجففات التي يكون بغطائها فتحة عليها صنبور يمكن بواسطته طرد الهواء المتمدد، وكذلك بواسطته يعادل الضغط خارج وداخل المجفف، أو تغطى الأشياء الساخنة في المجفف قبل الغلق إذا كانت تحتوي على عينات يخشى تناثرها بفعل تيارات الهواء التي تحدث داخل المجفف عند فتحه .

ومن المجففات أقطار وأحجام وأشكال متباينة ، وما له فتحة بغطاء أو بدون ، وماله صنبور علوي أو جانبي ، وما يمكن احتماله للحرارة في حمام مائي أو زيتي ، وما يتحمل التفريغ إلى غير ذلك . والحجم الأكثر شيوعاً هو ماله عنق مقاس ٣٢/٢٩م وارتفاع جسمه ١٨٠م وقطره الداخلي ٢٤٥م وارتفاعه بدون السدادة ٢٧٠م .

وكما سبق الذكر فأكثر المواد المجففة (المستخدمة في المجففات) انتشاراً هي كلوريد الكالسيوم (4-8 mesh) ، إلا أن حمض الكبريتيك المركز أفضل ولكنه خطر في تداوله ، كما تستخدم السليكاچيل مع دليل لإيضاح احتياجها لإعادة التنشيط ، وهي مفضلة الاستخدام إلا أن الأكثر كفاءة هي بيركلورات الماغنسيوم وكذلك خماسي أكسيد الفوسفور (فسفور بنتوكسيد) وكبريتات النحاس اللامائية .

ومن كبرى الشركات العالمية التي تنتشر منتجاتها الزجاجية في بقاع الأرض جميعها هي شركة JENA[ER] للزجاجات المعدنية ، وتنتشر منتجاتها تحت أسماء تجارية ، منها Jena Glas, Duran, Supremax, Fiolax, Duroplan, Verdura, AR-Glas, Durobax وجميعها علامات تجارية لشركة Jena Glaswerk Schott & Gen., Mainz في ماينز بألمانيا الغربية ، وتمتاز منتجاتها بثبات صفاتها الطبيعية والكيماوية ، ولها علامات مميزة على منتجاتها تشير لمقاومتها لكيماويات معينة أو عدم مقاومتها ، وذلك على درجات حرارة معينة ، كما أن لكل منتج مواصفات أخرى مثل السمك والقطر والسعة والطول والعنق ... إلخ .

وفيما يلي السعات (الحجوم) المختلفة لبعض منتجاتها الزجاجية بالملليلتر :

دورق مستدير القاعدة	دورق مخروطي مدرج	كأس فيليب بمصب	كأس ترشيح سميك الجدران بمصب	كأس للصبغات سميك الجدران	كأس مدرّج بدون مصب	كأس مدرّج بمصب
٥٠مل	٢٥ مل	١٥٠ مل	٢٥٠مل	١٠٠مل	٥٠ مل	٥ مل غير مدرّج
١٠٠مل	٥٠ مل	٢٥٠ مل	٥٠٠مل	٢٥٠مل	١٠٠ مل	١٠ مل غير مدرّج
٢٥٠مل	١٠٠ مل	٥٠٠ مل	١٠٠٠مل	٥٠٠مل	١٥٠ مل	٢٥ مل
٥٠٠مل	٢٠٠ مل		٢٠٠٠مل	١٠٠٠مل	٢٥٠ مل	٥٠ مل
١٠٠٠مل	٢٥٠ مل		٣٠٠٠مل		٤٠٠ مل	١٠٠ مل
٢٠٠٠مل	٣٠٠ مل		٥٠٠٠مل		٦٠٠ مل	١٥٠ مل
٣٠٠٠مل	٥٠٠ مل		١٠٠٠٠مل		١٠٠٠مل	٢٥٠ مل
٤٠٠٠مل	١٠٠٠مل		١٥٠٠٠مل			٤٠٠ مل
٦٠٠٠مل	٢٠٠٠مل		٢٠٠٠٠مل			٦٠٠ مل
١٠٠٠٠مل	٣٠٠٠مل					٨٠٠ مل
٢٠٠٠٠مل	٥٠٠٠مل					١٠٠٠ مل
						٢٠٠٠ مل
						٣٠٠٠ مل
						٥٠٠٠ مل
						١٠٠٠٠ مل غير مدرّج

دورق كلداهل	دورق مسطح القاعدة	قمع قطر حافته	زجاجات محاليل	بوتقة بمصب قطر حافتها
٥٠ مل	٥٠ مل	٣٥ مم	٥٠ مل	٤٠ مم
١٠٠ مل	١٠٠ مل	٤٥ مم	١٠٠ مل	٥٠ مم
٢٥٠ مل	٢٥٠ مل	٥٥ مم	٢٥٠ مل	٦٠ مم
٥٠٠ مل	٥٠٠ مل	٧٠ مم	٥٠٠ مل	٧٠ مم
٧٥٠ مل	١٠٠٠ مل	٨٠ مم	١٠٠٠ مل	٨٠ مم
١٠٠٠ مل	٢٠٠٠ مل	١٠٠ مم	٢٠٠٠ مل	٩٥ مم
	٤٠٠٠ مل	١٥٠ مم	٥٠٠٠ مل	١١٥ مم
	٦٠٠٠ مل	٢٠٠ مم	١٠٠٠٠ مل	١٤٠ مم
	١٠٠٠٠ مل	٣٠٠ مم	٢٠٠٠٠ مل	١٩٠ مم
				٢٣٠ مم

أنابيب اختبار	أنابيب طرد مركزى	دورق معيارى	مخبار	سحاحة	ماصة
قطر × طول	قطر × ارتفاع	١٠ مل	١٠ مل	١ مل	٠,١ مل
١٦ × ١٦٠ مم	٨ × ٧٠ مم	٢٠ مل	٢٥ مل	٢ مل	٠,٢ مل
١٨ × ١٨٠ مم	١٠ × ٧٥ مم	٢٥ مل	٥٠ مل	٥ مل	٠,٥ مل
٢٠ × ١٨٠ مم	١٠ × ١٠٠ مم	٥٠ مل	١٠٠ مل	١٠ مل	١ مل
٢٥ × ١٥٠ مم	١٠ × ٧٥ مم	١٠٠ مل	٢٥٠ مل	٢٥ مل	٢ مل
٢٥ × ٢٠٠ مم	١٢ × ١٠٠ مم	٢٠٠ مل	٥٠٠ مل	٥٠ مل	٥ مل
٣٠ × ٢٠٠ مم	١٦ × ١٠٠ مم	٢٥٠ مل	١٠٠٠ مل	١٠٠ مل	١٠ مل
	٢٤ × ١٠٠ مم	٥٠٠ مل	٢٠٠٠ مل		٢٥ مل
	٣٤ × ١٠٠ مم	١٠٠٠ مل			٥٠ مل
	٤٠ × ١١٥ مم	٢٠٠٠ مل			١٠٠ مل
	٤٤ × ١٠٠ مم	٥٠٠٠ مل			
	٥٦ × ٤٧ مم				

وعند استخدام أدوات قياس الحجم يستعمل المخبار لأحجام المحاليل التى لا يلزم أخذها بدقة شديدة (وقد يستعمل الكأس المدرج أو الدورق المخروطي المدرج) على أن يوضع على سطح مستو ثابت ، بحيث يكون سطح المحلول عند القراءة فى مستوى العين . أما الماصة غير المدرجة فتستعمل فى أخذ حجوم معينة بالضبط ، والماصة المدرجة كالسحاحة ، تستعمل لقياس أحجام أقل من سعتها الكلية أو لقياس أجزاء من الملليلتر .

ونظراً لأن العين تخطئ عادة فى قراءة سطوح المحاليل بقدر متباين على حسب قطر السحاحة أو خلافها (حوالي ± ٠,٠٤ مل فى المتوسط عندما يكون قطر السحاحة ١ سم) فإن استعمال المحاليل المخففة يقلل من نسبة هذا الخطأ عما لو استعملت المحاليل المركزة ، فإذا استخدمنا سحاحة قطرها ١ سم لمحلول يد٢كب أ٤ ١,٠ ع ، فإن الخطأ يقدر بحوالى ($٤٩ \times \frac{١}{١٠} \times \frac{١}{١٠٠٠} \times \frac{٤}{١٠٠} =$) ٠,٠٠٠١٩٦جم أو ما يوازي ٠,٢مجم ، أما لو استخدم حمض الكبريتيك الأساسي ، فسيكون خطأ العين عشرة أضعاف ما سبق حسابه ($٤٩ \times \frac{١}{١٠٠٠} \times \frac{٤}{١٠٠} =$) ٠,٠٠١٩٦جم أو ما يوازى ٢,٠مجم .

٨ ـ القمع وورق الترشيح Filter Papers & Funnel :

للترشيح الدقيق الكامل تراعى الاعتبارات القادمة :

١ ـ اختيار ورق الترشيح المناسب لحجم القمع (زجاجي أو بلاستك) .

٢ ـ نوع ورق الترشيح يجب أن يتناسب مع حجم حبيبات الراسب والغرض من الترشيح ، هل هو سرعة الترشيح أو دقة الفصل .

٣ ـ إجراء الترشيح بطريقة Decanting (لضمان سهولة غسل الرواسب) بنقل السائل لورق الترشيح أولاً يليه الراسب .

فورقة الترشيح المناسبة للقمع هي التي بعد وضعها في القمع يترك بين حافتها وحافة القمع حوالي ٢سم ، وينبغي ألا يرتفع سطح المحلول المضاف بحيث يترك حوالى ٢ سم من حافة الورقة ، مع تبليل القمع أولاً قبل وضع الورق فيه لتنطبق جيداً على سطح القمع الداخلي فيسهل الترشيح .

ويختلف ورق الترشيح كثيراً في وزن المتر منه وفي سمكه وفي مقاساته وتشربه ومسامه وسرعة الترشيح خلاله واحتوائه على رماد ونوع الرماد ونعومته ، وعليه فيتوقف تحديد نوع ورق الترشيح على نوع التحليل إن كان كمياً أو نوعياً ، وكذلك على التقديرات المختلفة والمحاليل المستخدمة وغير ذلك .

٩ ـ أجهزة قياس الكثافة والوزن النوعي :

ومن بينها مثلاً قنينة الكثافة Pycnometer وميزان وستفالWestphal Balance والهيدرومترات Hydrometers وفى الجهازين الأولين تقارن أوزان حجوم متساوية من السائل والماء على درجة حرارة معينة ، وفى الهيدرو مترات تقارن نسب حجوم الأوزان المتساوية . وهناك هيدرو مترات خاصة تعطي قراءات أخرى كالبومية Baume ، ومن درجات البومية يستنتج الوزن النوعي . والوزن النوعى هو نسبة وزن حجم معين من المادة عند درجة حرارة معينة ووزن نفس الحجم من الماء على درجة حرارة ٤ْ م .

١٠ ـ قياس اللزوجة :

هي المقاومة الناتجة عن احتكاك داخلي تبذله المواد اللزجة لقوى تغير شكلها ، أى أنها مقاومة الانسياب أو السيولة . وتقاس اللزوجة بالبويز Poise وهي وحدة مطلقة للزوجة ، وهي عبارة عن القوة التى إذا ما وقعت على وحدة المساحة بين مستويين متوازيين مساحة كل منها ١سم^2 ويبعدان عن بعضهما ١سم ، تحدث اختلافاً فى سرعة الانسياب بين المستويين مقدارها ١سم في الثانية .

وعادة تقدر اللزوجة النسبية للمواد أي بالنسبة لمواد قياسية كالماء (لزوجته المطلقة ١,٠٠٥ سنتيبويز عند ٢٠ْم) وتتشابه اللزوجة النسبية واللزوجة المطلقة إذا ما عبر عنهما بالسنتيبويز (٠,٠١ من البويز) . وتقدر عادة اللزوجة لمنتجات النشا اللزجة والزيوت والدهون باستخدام أجهزة قياس اللزوجة مثل جهاز اسطوالد Ostwald وجهاز ماك مايكل وجهاز هوبلر Hppler ، والأول زجاجي مكون من أنبوبة شعرية (وتتوقف معاملات اللزوجة على قطر الأنبوبة وقوة دفع السائل والزمن اللازم لهبوطه وطول الأنبوبة الشعرية ، وكثافة السائل وعجلة الجاذبية) ، والثاني يعتمد على اللف للوعاء الذي به العينة التي يسقط فيها

غاطس بزنبرك ، فيقاس مدى الالتواء المعرض له الزنبرك نتيجة لزوجة المادة اللفافة ، ويعرف هذا الجهاز بجهاز ماك مايكل الزنبركي للزوجة Mac Micheal Torsion Viscosimeter . بينما الجهاز الأخير ذو كرة معلومة الأبعاد يقاس الزمن اللازم كي تقطع مسافة معينة داخل السائل المختبر ، وتؤخذ اللزوجة كمقياس للنشاط الإنزيمي المحلل (المؤدي لخفض اللزوجة) كما أنها تستخدم في تقدير نسبة الرطوبة في بعض المركبات .

١١ ـ أجهزة الطرد المركزي Centrifuges :

وهي متعددة الأحجام والسرعات والكفاءات والأغراض (حسب قطر الحبيبات وصلابتها) ، فمنها ما يستخدم لفصل الغازات ، أو نزع الغازات ، أو للاستخلاص ، أو للفصل بدرجاته ، أو للترسيب ، أو للترشيح ، أو الغربلة ، وعلى ذلك تختلف سرعاتها وقوة مواتيرها ويتم حساب معامل سرعتها (ع) بمعلومية نصف قطر الأذرع (r) وسرعة زواياها (W) وسرعة الأرض (g) (٩,٨١ م/ث٢) من المعادلة $\frac{r \cdot w^2}{g}$ = ع .

وهي تتراوح من ٣٠٠ (لأجهزة الطرد المركزي الغربلي أو الترشيحي) إلى ٦١٠ (لأجهزة الطرد المركزي العالية Ultracentri fuges) ، وتستخدم في المعامل والمصانع سواء في مصانع الألبان ، أو الزيوت ، أو الصناعات القائمة على الدم والمستحضرات الطبية وخلافها . أما الأجهزة المعملية فمنها ما يعمل على تيار ١١٠ أو ٢٢٠ ڤولت وأقصى سرعة لها تتفاوت ، فمنها ما تصل إلى ٣١٠٠ لفة / دقيقة وحتى ١٢ ألف لفة / دقيقة وأكثر .



(شكل ٢) نماذج لبعض أجهزة الطرد المركزي المعملية

١٢ ـ قياس PH :

هناك طريقتان لقياس قيمة PH السوائل ، وهما : إما طريقة كهربية Electrometric أو طريقة لونية Colorimetric بمساعدة أدلة ، والطريقة الأولى هى الأدق لكنها مكلفة ، أما الطريقة الثانية فتتوقف على استخدام ورق ترشيح مشرب بالدليل ، أو خليط الأدلة الملونة الذي يرتبط بالورق بروابط اشتراكية على السليلوز ، أو محاليل الدلائل ، والعينات التى تحتاج وقتاً طويلا (أكثر من ١٥ دقيقة) حتى يتحول لون ورق PH معها تحتاج لتقدير حموضتها ، إما بسوائل أدلة بدلاً من الورق أو باستخدام الطريقة الكهربية .

وورق PH الحديث يعطى فروقاً لونية عند درجات PH المختلفة (وكسور الدرجات) مما يسهل القراءة ، كما أن منه ما يقيس حموضة الخبز واللحم والزيت ويقيس في السوائل الملونة والعكرة ، ومنها ما يقيس من PH صفر إلى ١٤ أو من صفر-٦ ، ٥-١٠ ، ٧,٥-١٤ بدقة ٠,٥ درجة ، أو يقيس من PH صفر-٢,٥ ، ٢,٥-٤,٥ ، ٤-٧ ، ٦,٥-١٠ ، ١١-١٣ بدقة ٠,٢-٠,٣ درجة أو ٥,٢-٧,٢ بدقة ٠,١-٠,٣ درجة أو ١-١٠ ، صفر-١٤ بدقة وحدة واحدة ، وخلاف ذلك كثير ، في صورة شرائط أو لفافات بدليل ألوان أو بدون ، أما السائل فمنه ما يقيس PH ٤,٥-٩,٠ بدقة ٠,٥ وحدة أو صفر-٥ ، ٤-١٠ ، ٩-١٣ مع دليل ألوان .

ويؤثر بالخطأ فى القياس اللونى للحموضة وجود كل من الأملاح المتعادلة ، الحرارة ، البروتينات ، قلويدات ، المذيبات العضوية وغيرها ، وذلك لأن الأدلة تركيبها الكيماوي إما أحماض أو قواعد عضوية ضعيفة التأين ، فبالتالي تتأثر درجة توزيعها على أجزاء المحلول بالعوامل المذكورة آنفاً (والدلائل تعمل كحامضية أو كقاعدية حسب رقم حموضة الوسط الموجودة به) ولون الجزيئات غير المتأنية للدليل يختلف عن لون أيوناتها ، وعليه فيختلف لون الدليل باختلاف PH الوسط .

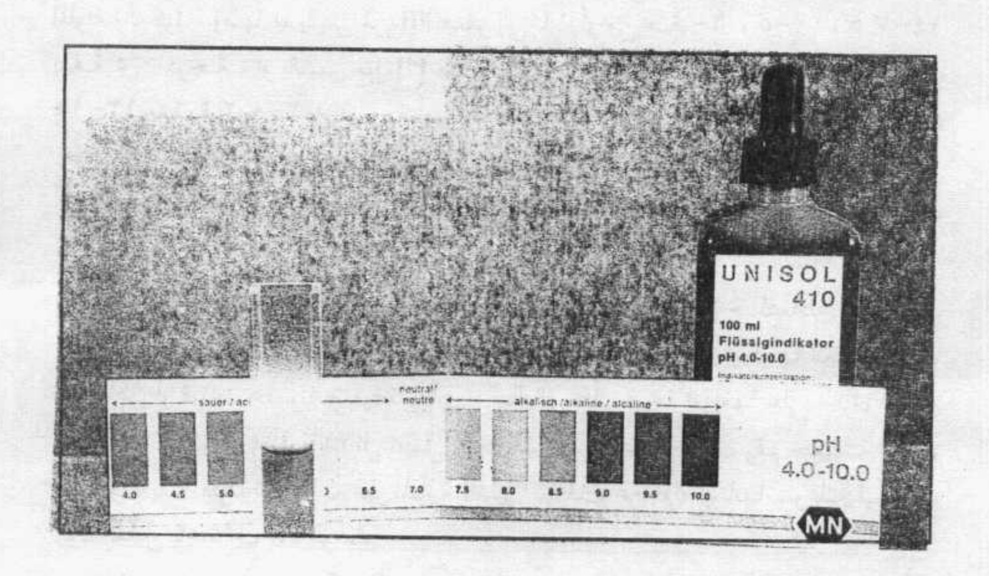
وهناك طرق لونية قديمة كطريقة La Motte ، وطريقة Hellige يتم فيها تجريب عدة أدلة حتى نصل للدليل المناسب ، ويقارن اللون فيها بأنابيب مقارنة أو زجاج ملون باستخدام صندوق خاص .

عند قياس PH بالأجهزة الكهربائية في عينة ، فإن كانت سائلة عادية تقاس فيها مباشرة، وإن كانت عالية اللزوجة تخفف ٥٠ ٪ ، وإن كانت مسحوقاً تخفف أو تعلق ٢٥ ٪، وإن كانت غير ذائبة ترج نصف ساعة قبل القياس .

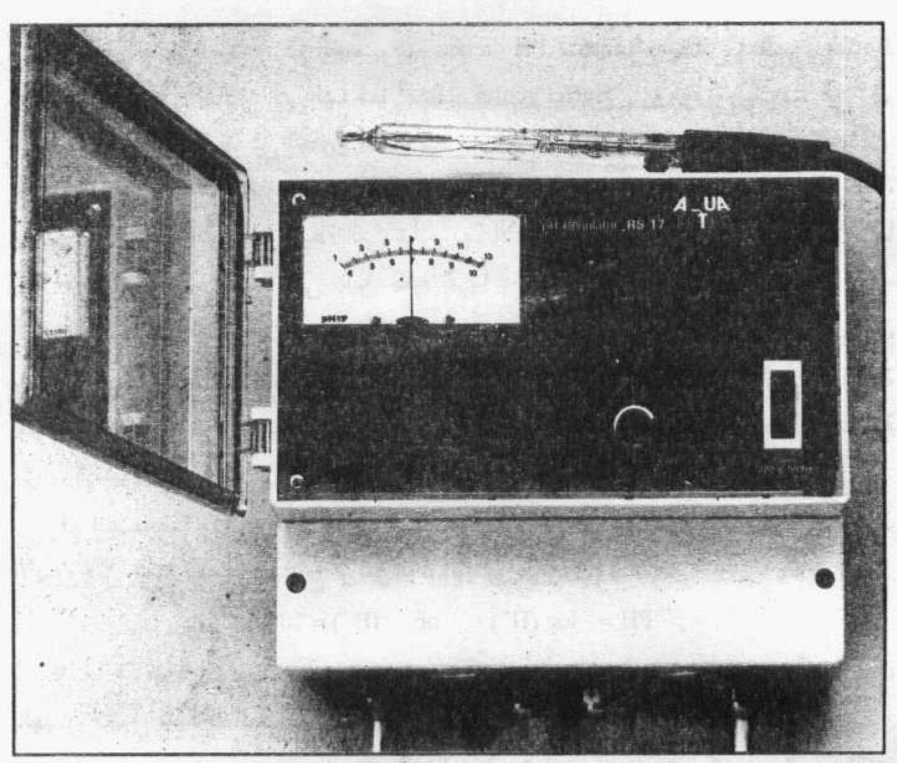
تعاير دقة الجهاز بمحلولين منظمين مختلفين فى رقم الحموضة ، مع غسيل الالكترود بالماء المقطر عقب كل قياس . أفضل ظروف جوية للقياس ٢٠-٤٠ ٪ رطوبة نسبية على درجات الحرارة الطبيعية ؛ على الرطوبة المنخفضة تسبب الشحنات الاستاتيكية عدم ثبات

القراءة ، كما أن ارتفاع الرطوبة يؤدي لامتصاصها مما يؤدي لتسرب كهربي شديد ، ومعظم أجهزة PH لا تعمل على رطوبة نسبية أعلى من ٩٠٪ على ٢٥°م ، وأفضل هذه الأجهزة حساسية ما كان يتأثر منها بشدة بالرطوبة .

يمكن تنظيف الالكترود بغمسه في حمض HCl مخفف ، ثم الغسيل بالماء المقطر ، ويمكن مسحه برفق بنسيج ناعم ممتص . يراقب عدم دخول الهواء في الدائرة الكهربية عند إلكترود كالومل بانخفاض مستوى كلوريد البوتاسيوم في القنطرة الملحية ، فيمكن إزالة الفقاعة الهوائية بتسخين الإلكترود في ماء دافئ أو بالتفريغ الهادى لفراغ القنطرة الملحية .



دليل سائل لقياس PH المحاليل لونيا



(شكل ٣) جهاز قياس PH كهربيا

رقم الحموضة PH هو عبارة عن اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الأيدروچين ، وإن كان صعباً قياس تركيز أيون الأيدروچين ، فيعبر عنه حديثاً بالنشاط الأيونى ، وهو لا يقاس مباشرة بل عن طريق خواص المحاليل ، كضغط البخار ، والانخفاض فى درجة التجميد ، أو الارتفاع فى درجة الغليان ، أو التوصيل الكهربي ، وهي نتيجة تركيز ونشاط الأيونات والظواهر الديناميكية الحرارية في المحلول ، وتقارن الحموضات باستعمال القوة الأُسية Ion-exponent وهي القيمة الدالة على قوة الأُس exponent الذي يجب رفع ١٠ إليه ليساوى تركيز أيون الأيدروچين بدون العلامة السالبة .

ويتراوح التركيز التقريبى لأيونات الأيدروچين في الأغذية من ١٠^-٧ إلى ١٠^-٢ جزىء/لتر (ماء إلى منتجات حامضية) ، واستعمال النشاط الأيونى هو أساس تقدير رقم الحموضة بالطريقة الكهربية الدقيقة ، أي أن الفرق بين رقمين للحموضة هو فرق فى جهد مقاسا بواسطة Galvanic Cell ، واصطلح على أن القوة الدافعة الكهربائية لخلية تحتوي محلول كلوريدي ذا تركيز جزيئى مقداره ١ هو مقياس أولى رمزى .

ولضبط أجـهزة قياس رقم الحمـوضة PH-meters تستعمل محاليل منظـمة Buffer Solutions ، وهي المحاليل التي لها فعل منظم Buffer action ، أي مقاوم للتغيير في رقم الحموضة الذي يحدث في المحلول عندما يتعرض لزيادة أو فقد للحامض أو القلوي ، وأكثر المحاليل المنظمة كفاءة عبارة عن مخاليط من أحماض ضعيفة أو قواعد ضعيفة وأملاحها ، وذلك راجع إلى الدرجة البسيطة التي تتأين بها الأحماض والقواعد الضعيفة بمقارنتها بالأحماض والقواعد القوية التي تتأين كلية تقريباً .

وتحضر المحاليل المنظمة من أملاح معاد بلورتها Recrystalized معروفة التركيب ، بإذابتها في ماء معاد تقطيره Redistiled Water ، وتخفف تخفيفاً صحيحاً لتكون مضبوطة ودقيقة معلومة رقم الحموضة ، ويزداد الفعل المنظم أو القوة المنظمة للمحاليل المنظمة بزيادة تركيزها .

رقم الحموضة (PH) هو ـ كما ذكر ـ عبارة عن اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الأيدروچين فمنه يمكن استنتاج تركيز أيون الأيدروچين (H^+) كالتالي :

$$PH = - \log (H^+) \qquad or \qquad (H^+) = 10^{-PH}$$

فارتفاع رقم الحموضة دليل انخفاض تركيز أيون الأيدروچين وارتفاع تركيز أيون الهيدروكسيل للعلاقة العكسية بين الأيونين .

ورقم الحموضة يحدد مدى انتشار الكائنات الحية الدقيقة خاصة البكتريا ، فهي الأكثر حساسية لأيونات الأيدروچين عن الخميرة والفطر ، كما يؤثر تركيز أيون الأيدروچين كذلك على النشاط الإنزيمي حتى يزداد الفناء البكتيري والإنزيمي بارتفاع الحرارة على وجه الخصوص ، عند زيادة تركيز أيونات الأيدروچين .

ويتوقف القياس الكهربي الدقيق لرقم الحموضة على أساس قياس فرق الجهد الكهربي بالمليڤولت ، باستخدام أقطاب متباينة منها ما هو هيدروچيني ، كالوميل ، كوينهدرون ، زجاجي .

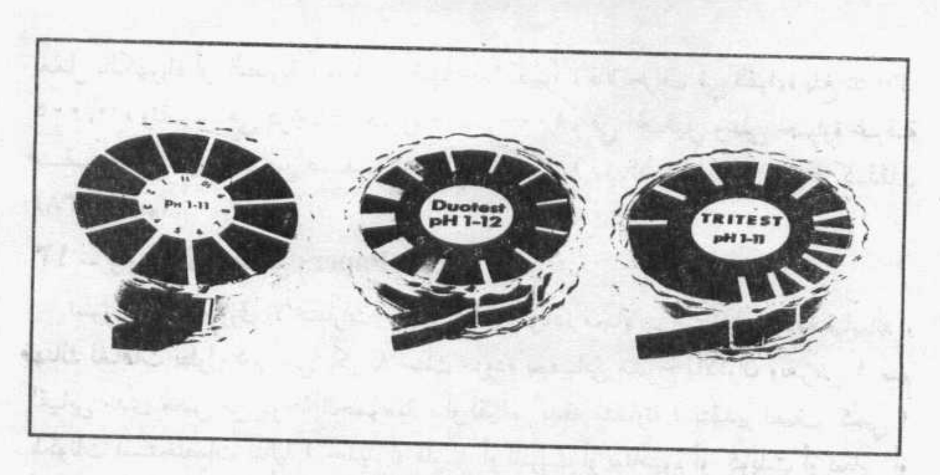
والقطب (الالكترود) الزجاجي هو الأكثر استخداماً ، وهو أنبوبة طرفها ينتهي بفقاعة من الزجاج الغني بالجير الصودي ، تحتوي محلول معلوم رقم حموضته ومغموس فيه قطب يعطي فرقاً ثابتاً في الجهد Constant Potential Differences ، ويغمس هذا القطب في المحلول المراد قياس رقم حموضته ، ويكمل التوصيل الكهربي ، والقطب الزجاجي أفضل من الأيدروچيني ، إذ يستخدم في أنظمة الأكسدة والاختزال والمحاليل غير المنظمة إلا أنه سهل الكسر ، بينما القطب الأيدروچيني لا يستعمل مع المواد الرغوية أو المؤكسدة أو المولدة للغازات أو المسببة للرغاوي أو غير المنظمة أو المواد المختزلة القوية .

ووصلت هذه الأجهزة من الدقة وصغر الحجم ما يجعلها شائعة الاستعمال ، فمنها ما

يعمل بالكهرباء أو بالبطارية ، وبلغت دقتها حدا كبيراً ، فالانحراف في القراءة بلغ ± PH ٠,٠٠٥ ، وتقيس في درجات حرارة صفر-١٠٠°م في المحاليل وعلى حرارة غرفة صفر-٥٥°م، وبلغت من صغر الحجم الكثير (١٠×٥×١٧سم) والوزن كذلك (٠,٣٨ كجم).

١٣ - ورق الاختبار Test Papers :

تطورت صناعة ورق الاختبارات ، وزاد انتشاره لزيادة مجالات استخدامه ودقة قياساته ، فهناك لفافات بطول ٥م على بكر بلاستك مزودة بمقياس مدرج بالألوان وبعرض ١ سم لقياس مدى معين من درجة الحموضة ، أو لقياس بدقة متفاوتة (بتقدير نصف كمي) لمكونات المستخلصات المائية (حديد أو فلوريد أو نيتريت أو بوتاسيوم أو كوبلت أو نحاس أو ألومونيوم أو كرومات أو عسر الماء أو النيكل أو البيروكسيد أو الكبريتيد أو الزنك أو القصدير أو الزرنيخ أو الزئبق) ، كما استغلت أوراق الاختبار في تقدير الرطوبة النسبية للجو ، وفي الفحص لالتهاب الضرع في الحيوانات ، أو الكشف عن الزيت وخلاف ذلك كثير ، كما يستخدم في اختبار وظائف الأعضاء كما في تحليل البول من خلال الكشف عن نواتج الميتابوليزم من إنزيمات وصبغات وسكر وأملاح وهيموجلوبين وغيره .



ورق اختبار لتقدير PH



(شكل ٤) استخدام ورق الاختبار فى تقدير النحاس فى الماء

١٤ ـ قياس الحرارة :

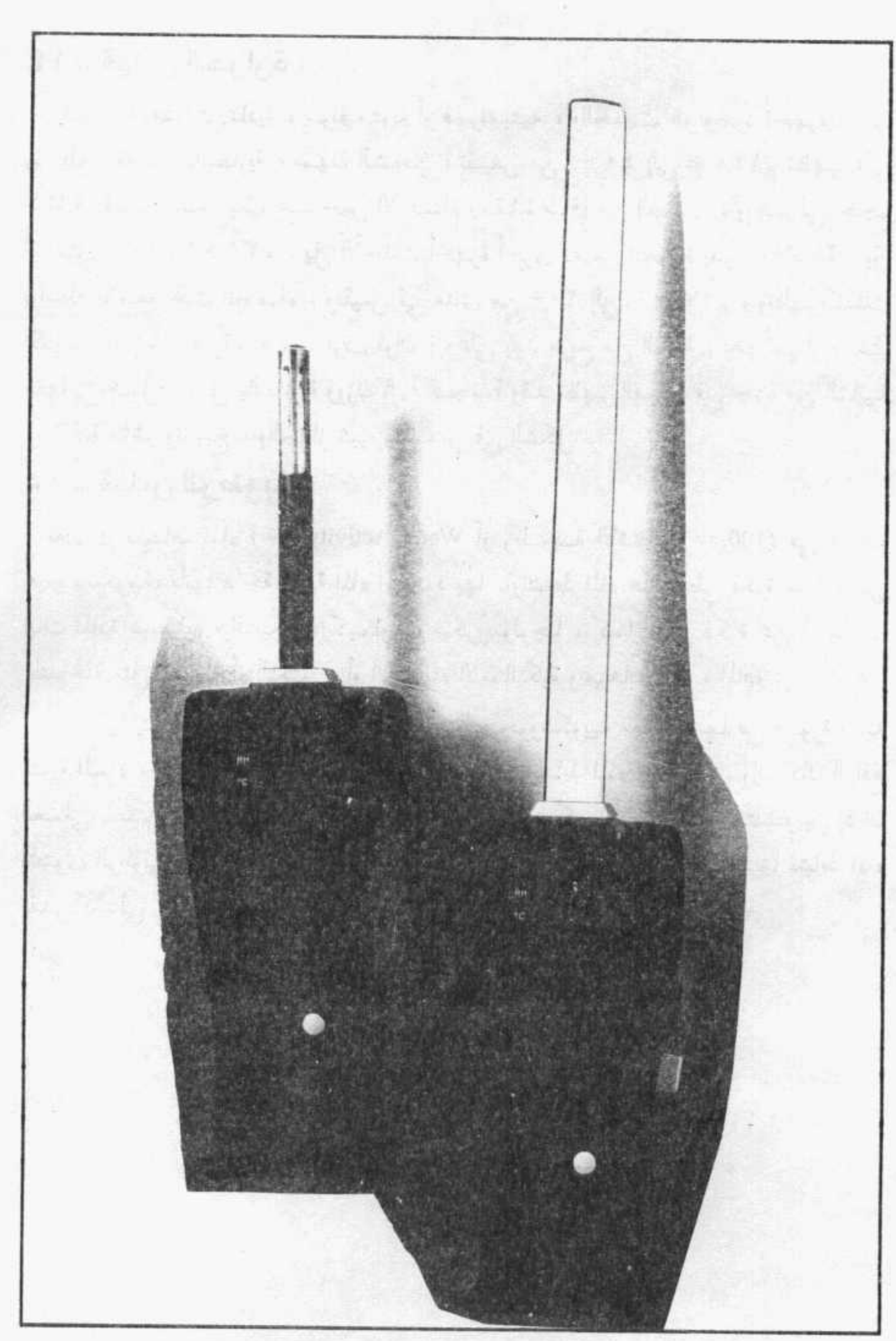
تتم بترمومترات عادية ، سواء مئوية أو فهرنهيتيه ، والحديث هو وجود أجهزة جيب بسيطة ، تعمل بالبطارية ، سهلة الشحن ، تقيس من - ٤٠ إلى + ١٤٠°م تظهر على شاشة رقمية أوتوماتيكياً عند حس الأجسام بمقدم ساق من الصلب ، وإجمالي حجم الجهاز ٧٩×١٥٥× ٣٨م . بل الأحدث أجهزة أخرى تقيس الحرارة بدون ملامسة ، بل بواسطة الأشعة تحت الحمراء ، وتقيس في مدى من -٢٠ إلى +١٧٠٠°م ، وتظهر كذلك القراءة على شاشة رقمية في ظرف ثوان ، وعلى بعد مريح من العينة ، وهو جهاز صغير سهل الحمل يعمل بالبطارية ووزن ٠,٩كجم ، وقد تظهر القراءة في جزء من الثانية وبواسطة مؤشر وتدريج ، والجهاز شبيه بالمسدس في الشكل .

١٥ ـ قياس الرطوبة :

يعرف نشاط الماء Water Activity (aw) أو رطوبة الاتزان (100 aw) في مادة هيجروسكوبية، بأنها درجة حرية الماء الموجود بها . ونشاط الماء هذا يعطي فكرة مباشرة عن ثبات المادة طبيعياً ، ميكانيكياً ، كيماوياً ، ميكروبيولوجيا ، كما يعطي فكرة عن العمليات المتداخلة مثل السيولة أو التكتل ، أو الكهرباء الاستاتيكية وغيرها في هذه المادة .

وعمليا يتم تقدير درجة الرطوبة في المواد الهيجروسكوبية معبراً عنها في صورة نسبة مئوية للماء ، ويمكن نظرياً الربط بين المحتوى المائى ونشاط الماء والعكس ، وإن كان الواقع العملي يحتم معاملتهما منفصلين تماماً عن بعض ، كما أنهما ليسا متساويين إذ أن المحتوى الرطوبي نسبة مئوية للماء الموجود منسوباً للمادة الجافة أو الرطبة ، بينما نشاط الماء يقدر كالتالي :

$$aw = p/ps$$



(شكل ٥) أجهزة لقياس كل من الرطوبة النسبية ودرجة الحرارة

حيث P = ضغط بخار الماء خارج مسطح المادة

P_S = ضغط بخار الماء خارج مسطح ماء نقي على نفس درجة حرارة المادة

%GF = 100 aw

حيث GF% = رطوبة الاتزان

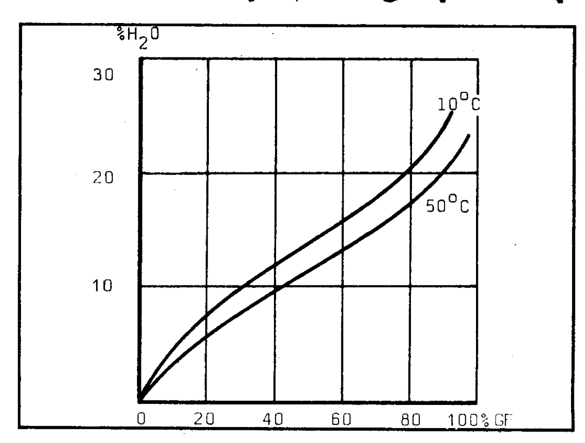
وبتقدير aw يمكن التنبؤ بأي الكائنات الحية يمكن تواجدها في هذه المادة .

وقد نشرت FDA هذه الحدود التي منها مايلي :

aw المثلى للنمو	الكائن الحي الموجود على هذه الـ aw
٠,٩١ - ٠,٩٥	معظـم البكتيريا
٠,٨٨	معظـم الخمائر
٠,٨٠	معظـم فطريات العفن

فزيادة aw تزيد من أثر تفـاعل Maillard - Reaction حتى aw = ٠,٦-٠,٧ ثم بعـد وصوله للحد الأقصى ينخفض سريعاً ، كما تتوقف مدة حفظ المواد الغذائية على قيـمة aw التي تؤثر على تغيير لون الكاروتين ، وأكسدة الميوجلوبين في اللحم ، وأكسدة البروتينات والڤيتامينات وتفاعلات التلون الغير إنزيمية .

كما أن انخفاض aw عن ٠,٨ يبطئ من التفاعلات الإنزيمية وبانخفاض aw يرتبط الماء أكثر بالمادة ، ويحتـاج إلى حرارة أكبر لفقده عند التجفيف ، فهناك علاقة طردية بين المحتوى المائي والاتزان المائي تتضح من الرسم التالي :

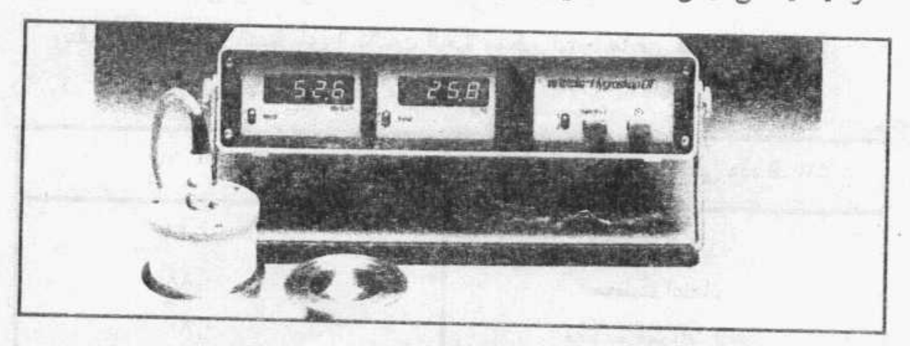


(شكل ٦)

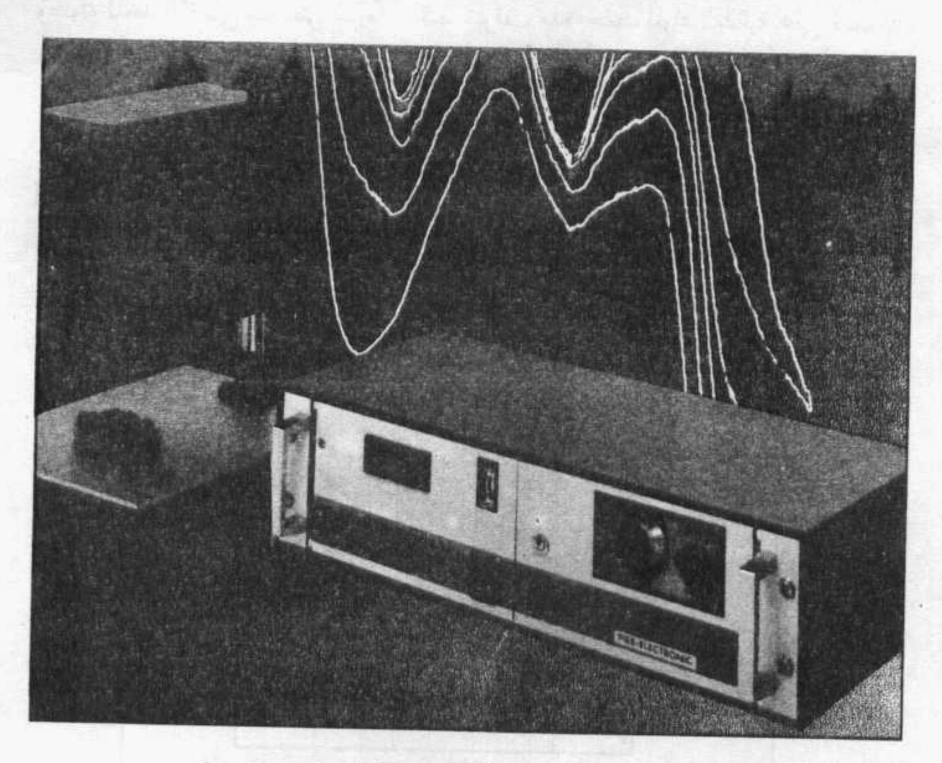
ويعرف نشاط الماء أو الرطوبة الاتزانية النسبية بأنها النسبة المئوية للرطوبة النسبية (%RH) الناتجة بالاتزان مع العينة في نظام مغلق على حرارة ثابتة .

$$\%RH = 100 \times aw$$

وعليه فيمكن قياس aw بمجس يقيس الرطوبة النسبية (تحت الظروف سابقة الذكر) .



هيجرو سكوب لقياس الرطوبة والنشاط المائي

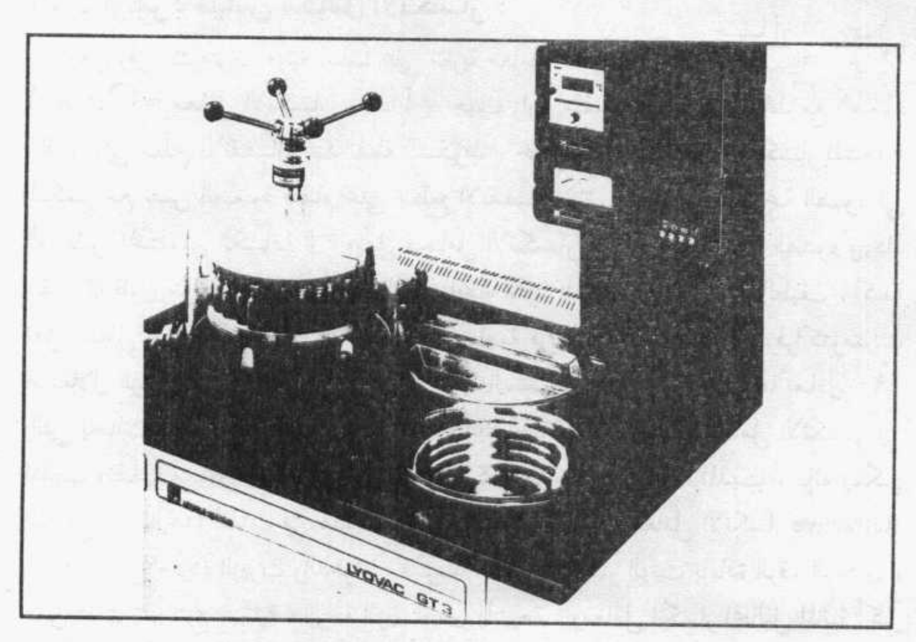


(شكل ٧) جهاز قياس انعكاس ضوئي لتقدير الرطوبة ضوئياً

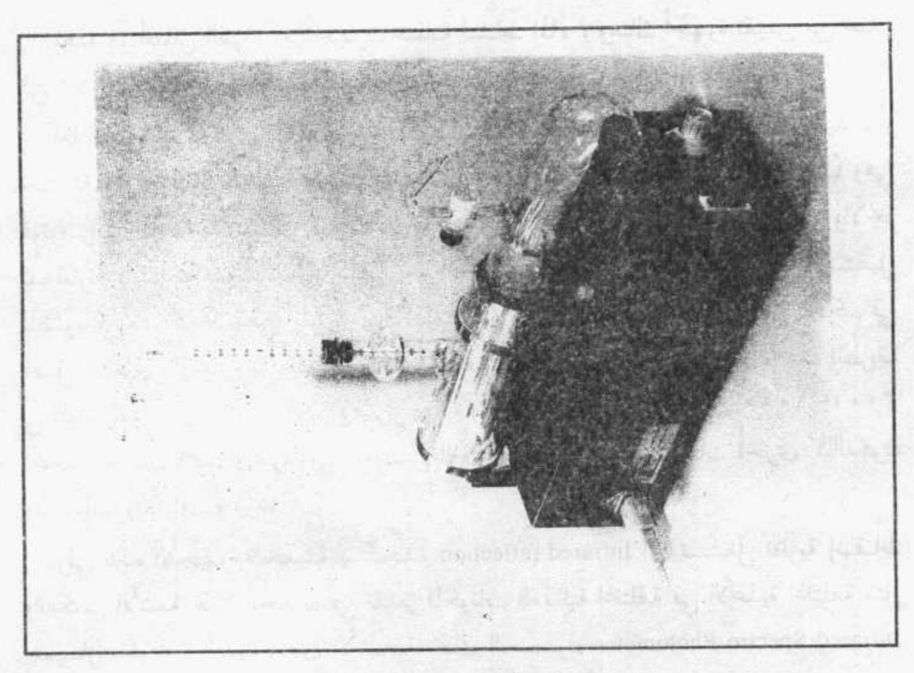
وهذا هو أساس القياس بالأجهزة المختلفة لنشاط الماء ، وهناك أجهزة تقيس من صفر إلى ١٠٠ ٪ رطوبة نسبية تحت ضغط جوي مختلف ودرجات حرارة مختلفة .

أما الرطوبة أو المحتوى المائي فتقاس بالأفران العادية ، أو ذات المراوح ، أو بالتجفيد ، أو تحت تفريغ ، وهناك أجهزة طورت منذ ثلاثين عاماً لقياس المحتوى الرطوبي ضوئياً وهي فوتومترات خاصة باستصدار ضوء متداخل مكون من شعاعين ، أحدهما للقياس والآخر للمقارنة ، يتم عكسهما بمرايا ليمرا بعد انعكاسهما من العينة على فوتومتر (مستقبل للضوء) بعد التحكم في أطوال موجاتهما بفلاتر (مرشحات) خاصة ، ويتحكم في فصل الشعاعين إليكترونيا وكذلك شدة الشعاعين يمكن تغييرهما ، وتستخدم هذه الطريقة في المواد الصلبة والمساحيق دون الإضرار بها ، وتقيس على أطوال موجات ١٠٠٠-٣٠٠٠ نانومتر حسب المحتوى الرطوبي ، وبنفس الجهاز يمكن تقدير مكونات أخرى كالدهون والبرتينات والألياف وغيرها .

وفي هذه الأجهزة الحديثة يستخدم Infrared reflection أي تستغل نظرية إسقاط وانعكاس الأشعة تحت الحمراء في تقدير المكونات الغذائية المختلفة في الأغذية المختلفة مثل جهاز مطياف الضوء ذى الأشعة تحت الحمراء Infrared Spectro Photometer وجهاز (Infrared Milk Analyzer (I R M A الذي يقدر أكثر من مكون في عديد من عينات اللبن في نفس الوقت .



(شكل ٨) جهاز تجفيد (تجفيف بالتجميد)



(شكل ٩) أحد أجهزة التجفيف تحت تفريغ

١٦ ـ أجهزة قياس معامل الانكسار :

وهي رفر اكتومترات مبنية أساساً على نظرية معامل الانكسار $\odot = \frac{\text{حا أ}}{\text{حا ب}} = \frac{س_1}{س_2}$ [حيث $\odot$ = معامل الانكسار ، حا أ = جيب زاوية سقوط الشعاع الساقط مع العمود المقام على سطح الانفصال عند نقطة السقوط ، حاب = جيب زاوية الانكسار للشعاع المنكسر مع نفس العمود المقام على سطح الانفصال ، $س_1$ ، $س_2$ = سرعة الضوء في الوسطين المختلفين الكثافة] . ويقل معامل الانكسار بزيادة طول موجة الضوء ويزداد بنقصان طول موجة الضوء ، أي يزداد في اتجاه اللون البنفسجي من ألوان الطيف . كما يقل معامل الانكسار بارتفاع درجة الحرارة خاصة في السوائل ، وتصمم الرفراكتومترات باستغلال الزاوية الحرجة Critical angle (زاوية السقوط التي زاوية انكسارها تعادل ٩٠°) والتي يحدث بعدها الانعكاس الكلي Total Reflection ، وبمعلومية معامل الانكسار في المذيب وتقدير معامل الانكسار لمحلول من مركب ما مذاب في هذا المذيب ، فإنه يمكن استنتاج كمية هذا المذاب في هذا المحلول. ويدلنا هذا المقياس (معامل الانكسار Refractive Index) على جودة الزيوت والدهون ، فيزداد معامل انكسار الزيت بزيادة الرقم اليودي ، فمن ذلك يتم تتبع عملية هدرجة الزيوت غير المشبعة . ومعامل انكسار المحاليل المائية أكبر من معامل انكسار الماء (باستثناء كحول الميثايل) . ويتغير معامل انكسار السوائل بتغيير

تركيز المواد الصلبة الذائبة فيها ، فيمكن تقدير الكربوهيدرات الذائبة في محاليلها من معامل انكسارها ، ويتم تقدير معامل الانكسار على حرارة الغرفة ثم تعدل إلى ٢٠م من جداول خاصة ، ومن أشهر الرفراكتومترات هي رفراكتومترابى Abbe Refractometer ، رفراكتومتر الغطس Dipping or Immersion Refractometer ، رفراكتومتر الجيب لزايس Zeiss ، رفراكتومتر جيورتز Georz .

ويتكون رفراكتومترابى من منشورين وأنبوبتين متداخلتين ، وتوضع العينة على المنشور السفلي ويغلق الغطاء ويمر الضوء بواسطة مرآة موضوعة بزاوية معينة ، ويظهر الضوء المنعكس في صورة خلفية داكنة Dark Background ، تحرك الأنابيب التلسكوبية حتى يظهر الظل الأسمر متمركزا في متلاقي شعرتي التلسكوب .

وأفضل ضوء للرفراكتومترات هو ضوء النهار ، أو ضوء صناعي ٢٥ أو ٤٠وات على بعد ١,٥-٢ قدم (٤٥-٦٠سم) من الرفراكتومتر .

ويجب حفظ المناشير دائماً نظيفة ، إذ تنظف بماء دافئ وتجفف بورق ترشيح ، ولا يجب خدشها بالأقمشة المختلفة (فلا يستعمل إلا القطن) ، وينظف الدهن باستخدام التولوين ثم الأسيتون ثم الماء الدافئ .

١٧ ـ الاستقطاب الضوئي :

وهو تحويل مستوى مسار الضوء بعد نفاذه في المركبات المعدنية أو العضوية ، فالمادة المؤدية لهذا التحويل يطلق عليها أنها فعالة ضوئياً Optically active، فإذا حول مستوى الضوء لليمين ، أي في اتجاه سير عقرب الساعة ، سميت المادة يمينية التحويل Dextro Rotatory ، أي أن الدوران موجب ، والعكس صحيح ، وتقاس قوة الفعل (التحويل) الضوئي للسوائل بجهاز قياس الضوء المحول Polariscope or Polarimeter وتزداد زاوية التحويل بزيادة تركيز المادة الذائبة . وينشأ الفعل الضوئي لمعظم المركبات العضوية عن وجود ذرة أو أكثر من ذرات الكربون غير متماثلة Assymetric ، أي يحيط بها ذرات أو مجاميع مختلفة ، ولكل مركب فعال ضوئي مشابه Isomer له نفس خواص المركب الأول (طبيعية وكيماوية) ، ويختلف عنه فقط في اتجاه تحويل الضوء المستقطب ، ويطلق عليهما بالمشابهات الضوئية ، أو التوائم الضوئية Optical Antipodes. والبلورات المستقطبة للضوء مثل الكالسيت ، ايسلاندسبار ، والكوارتز .

وتتكون البولاريمترات من جزء خاص باستقطاب الضوء (مستقطب Polarizer) ، وجزء محلل يشبه المستقطب تماماً ، أنبوبة المحلول المراد تحليله في طريق مسار الضوء بين المستقطب والمحلل ، عدسة توجيه الضوء ، عدسات تمكن الناظر من مشاهدة عمل الأجزاء السابقة ، تدريج دائري Circular Scale مبين عليه تدريج الزاوية التي يدور بمقدارها المحلل بحيث يسمح بنفاذ أكبر قدر ممكن من الضوء . ويصنع المستقطب والمحلل من بلورات

الايسلندسبار في صورة منشور نيكول Nicol Prism ، وكمصدر للضوء يستخدم ضوء بخار الصوديوم ، إذ يعطي ضوءاً موحد الموجة تقريباً ، ويستخدم البولاريمتر في قياس تحويل الضوء لمحاليل السكر مثلاً .

١٨ ـ قياس الألوان Photometry :

مبنى على قياس الضوء النافذ من المادة ، ووحدة الطاقة الضوئية هي الفوتون Photon ، والضوء المنظور (٤٠٠–٧٦٠ ملليميكرون) أو المرئي ـ أي الملون ـ يقسم تبعاً لطول الموجات وبالتالي الألوان كالتالي :

اللون المنظور	أحمر	برتقالي	أصفر	أخضر	أزرق	بنفسجي
مدى طول الموجة مليميكرون	٦٢٠–٧٦٠	٥٩٠–٦٢٠	٥٧٠–٥٩٠	٥٠٠–٥٧٠	٤٥٠–٥٠٠	٤٠٠–٤٥٠

وبزيادة طول الموجة الضوئية عن ٧٦٠ مليميكرون تبدأ الموجات تحت الحمراء infra red التي قد تصل أطوالها إلى أميال ، وبقصر طول الموجة عن ٤٠٠ مليميكرون تبدأ الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet ، ويعرف مخلوط كل الألوان لمختلف الموجات للضوء المرئي بالضوء الأبيض وتتفاعل الطاقة الضوئية (الفوتونات) المارة فى المادة مع جزيئات هذه المادة لإحداث زيادة فى الطاقة الدورانية للجزيئات ـ وكذلك الطاقة الاهتزازية ـ ولإثارة الشحنات فى الجزيئات ، وعلى ذلك تختلف أطياف الامتصاص Absorption Spectra باختلاف المواد، وذلك لاختلاف المواد فى احتياجاتها من الضوء لإحداث التأثيرات المذكورة هذه ، ويتوقف علم قياس الألوان على هذه الخاصية ، إذ يتم قياس تركيزات المركبات المختلفة بقياس الضوء الممتص عند أطوال الموجات التى يحدث لها امتصاص بواسطة هذه المركبات

تعرف الكثافة الضوئية Optical Density بأنها لوغاريتم مقسوم شدة الضوء قبل نفاذه فى المادة على شدته بعد نفاذه ، أو هى حاصل ضرب معامل الامتصاص Absorption Coeffi cient (ثابت على طول الموجة ودرجة الحرارة) فى التركيز (جزىء/لتر أو جم/لتر) فى سمك الوسط المار منه الضوء ، أو هى لوغاريتم مقلوب النفاذية transmission .

أى أن التركيز = الكثافة الضوئية/معامل الامتصاص X طول العمود النافذ منه الشعاع.

ويسمى معامل الامتصاص (في حالة التركيز بالجزيئات في اللتر) بمعامل الانطفاء Extinction Coefficient ، وهو متغير بتغير لون المحلول المختبر وتبعاً لطول موجة الضوء المستعمل وبرسم منحنى للعلاقة بين طول الموجة الضوئية ومعامل الانطفاء يسمى منحنى الامتصاص للمادة الملونة (وذلك باستخدام المطياف Spectrophotometer) ، وهو الذي يظهر ذروة المنحنى Peak Maxima التي تمثل منطقة أعلى امتصاص للضوء ، وهي خاصية تميز المواد عن بعضها ، وتفيد في قياس تركيز المادة المختبرة عند استخدام ضوء ذي طول

موجة مساوية للموجة التي يحدث عندها ذروة الامتصاص .

ويؤثر تركيز المحلول المختبر على الضوء النافذ وعلى لون المحلول (الضوء الغير ممتص) . ويمكن تقدير تركيز مركب ما في محلول بمقارنة قوة امتصاص الضوء ، أو قوة انتقال الضوء (نفاذيته) أو بكثافة اللون ، وذلك بمحلول معلوم التركيز .

واللون ناتج من انعكاس الضوء الغير ممتص بواسطة المادة ، والواقع على شبكية العين منتجا الإحساس باللون .

وأبسط أجهزة قياس الألوان هي قرص الألوان Colour Discs ، وقاموس الألوان Colour Dictionary مثل قاموس مرتز وباول Maerz & Paul وأجهزة قياس الألوان البصرية Vision Colorimeters ، أو المقارنة البصرية Visual Comparison المعتمدة على العين ، بمقارنة شدة الضوء النافذ من محلول مراد قياس تركيزه مع زجاج ملون بدرجات عديدة ، ومنها أجهزة هلجا ولوفيبوند Hellige Comparator ، Lovibond Tintometer ، ويستخدم الأخير ثلاث مجاميع من الألوان (أحمر ، أصفر ، أزرق) في كل منها خمسون شريحة متدرجة الألوان ، ولكل منها رقم دال على قيمة امتصاص معينة . وقد تستخدم المقارنة للمجهول مع محلول قياسي من المادة المراد تقديرها . وحساسية العين تختلف باختلاف الألوان واختلاف الأضواء والأشخاص .

ومن الطرق البسيطة الأخرى : طريقة التخفيف Dilution Method ، وفيها يستخدم محلول قياسي يقارن به العينة مجهولة التركيز ، ويتم تخفيف أحدهما حتى نحصل على شدة لون واحدة للمحلول القياسي والمجهول ، وهذه أقل دقة عن سابقتها ؛ لأن التخفيف يضر باللون وشدته وهي أساس التقدير .

وللتغلب على مساوئ الطرق البسيطة هذه يجرى تقدير ومقارنة شدة الضوء بعد خروجه من المواد الملونة بالوسائل الكهربية التي أهمها انبعاث الالكترونات Emission of Electrons من سطوح معدنية عند تعرضها للضوء في فراغ أو في وجود غاز تحت ضغط منخفض ، وهو أساس الخلايا الضوئية Photo Tubes ، وهو الشائع الاستخدام في أجهزة قياس الألوان كهربيا أو الأجهزة الضوءكهربية Photoelectric Colorimeters ، والتي تمتاز بزيادة الدقة والحساسية ، وقصر الوقت اللازم للاختبار ، مع ضآلة الحجم اللازم للفحص من المادة المختبرة ، مع سهولة التقدير الكمي لتركيزات المحاليل باهتة الألوان التي لايمكن تقديرها بالعين المجردة ، كما يسهل تقدير مادة ملونة في وجود مواد ملونة أخرى .

وتستخدم مع هذه الأجهزة مرشحات ضوء Light Filters للسماح بالضوء الذي يمتصه المحلول فقط بالمرور دون الموجات الأخرى لأنه لو مرّ الضوء بدون المرشح للضوء فإن كمية الضوء الممتص بواسطة المحلول تكون قليلة وتكون المرشحات من الزجاج الملون ، أو

منشورات (Prisms) ، أو شبكات تشتت (انعطاف) الضوء (Diffraction Grating) . ومن هذه الأجهزة الكهربية لقياس الضوء Spectrophotometers Colorimeters ، وأبسطها مقياس ايفلين Evelyn Colorimeter ، ومقياس كليت سومرسون Klett - Summerson Photoelectric Colorimeter ، وتتركب أساساً من مصدر ضوئي ومركم ومقاومة متغيرة وأنبوبة المحلول وخلية كهرو ضوئية وجلفانومتر ومرشح ضوء ، ويكون تركيز المجهول مساوياً لقراءة تدريج المجهول مضروبا في تركيز المحلول القياسي / قراءة التدريج للمحلول القياسي .

ونظرية مطياف الضوء ، أو أجهزة مقياس الألوان الكهربية تعتمد على قوانين لامبرت وبير Lambert and Beer ، وخلالها تعرف عدة مقاييس منها : العبور Transmittance or Transmission (T) وهي نسبة الضوء المار إلى الضوء الساقط أو (T_s) وهي نسبة العبور من خلال محلول ملون إلى العبور من خلال المحلول المذيب فقط ، الكثافة الضوئية Optical Density (OD) أو الانطفاء Extinction (E) أو الامتصاص Absorbency (A) وهي لوسط ما عبارة عن النسبة اللوغاريتمية لشدة الضوء الساقط إلى الضوء الخارج (ويمكن تحويل النسبة المئوية للعبور (T%) إلى كثافة ضوئية (OD) حيث إن $OD = 2 - \log T_s$) .

ومعامل الانطفاء Extinction Coefficient (أو دليل الامتصاص Absorbence Index) عبارة عن OD / وحدة طول ممر ضوء ، معامل الانطفاء النوعي أو الخاص Specific Extinction Coefficient (الامتصاص) هو الكثافة النوعية لكل وحدة طول ممر ضوئي ووحدة تركيز ، وعندما يجهل الوزن الجزيئي لمادة ما فإن هذا المصطلح يستخدم عادة مع كتابة التركيز أعلاه وطول الممر أسفله ، فمثلاً ($E^{1\%}_{1cm}$ 440nm) = 50 أي أن مادة مجهولة عند طول موجة ٤٤٠ نانومتر وطول المحلول المار فيه الضوء اسم (أي عرض الخلية Cuvette التي بها المحلول المراد قياسه في الجهاز) والتركيز ١ ٪ (١جم/١٠٠مل) والامتصاص A = ٥٠، ومعامل الانطفاء الجزيئي (E) Molecular Extinction Coefficient (أو الامتصاص المولر Molar Absorptivity أو دليل الامتصاص المولر Molar Absorbency Index) هو معامل الانطفاء النوعي لتركيز ١ جم مول / لتر (محلول مولر) وطول ممر ١سم .

ويعتمد التحليل الضوئي الكهربي على مقارنة تركيز مادة ما بقياس الامتصاص النسبي للضوء بالنسبة لتركيز معلوم من هذه المادة (محلول قياسي) ، وفي هذه الطرق تحل الخلايا الكهروضوئية Photoelectric Cells محل العين (في المقارنة البصرية البسيطة) ، ومن هذه الخلايا اشتق اسم طرق التحليل اللوني الكهربي الضوئي Photoelectric Colorimetry ، وفيها يمر طول موجة موحد mono chromatic باستخدام مرشحات ؛ لذا سميت الأجهزة كذلك Filter Photometers والفارق بين جهاز قياس الضوء كهربيا Colorimeter وجهاز المطياف Spectrophotometer ، أن الأول يحتوي على خلية كهروضوئية والثاني

يحتوي بالإضافة على الخلية الضوئية كذلك جهاز قياس الطيف Spectrometer المنتج للضوء الملون لأي لون معين أو طول موجة محدد Monochromator ويدرج لأطوال موجات (نانومتر أي ملليميكرون nm = mu) فبالاسبكترومتر يحدد طول الموجة وبالفوتومتر تقاس شدة هذا الضوء .

وفيما يلي بعض وحدات القياس المستعملة :

١ انجستروم Angstrom unit (Å) = $١٠^{-١٠}$م = $١٠^{-٨}$ سم .

١ ملليميكرون Millimicron (mu) (أو nm) = $١٠^{-٧}$ سم = ١٠ أنجستروم .

١ ميكرون micron U = $١٠^{-٤}$ سم = $١٠^{٤}$ أنجستروم .

سرعة الضوء = ٢٩٩٧٩٦ × $١٠^{١٠}$ سم/ثانية .

ويرجح بعض العلماء عدم تسمية أجهزة قياس اللون كهروضوئي photoelectric colorimetry بأنها colorimeters ؛ بل يفضلون تسميتها Absorptiometers لأنها تقيس كمية الضوء الممتص ، وأساس تركيبها مبنى على :

١ ـ مصدر ضوئي تختلف شدته باختلاف الأجهزة .

٢ ـ وسيلة تحكم في طول الموجة وقد تكون مرشحات Filters ، أو شباك انعطاف الضوء Diffraction Grating ، أو مناشير Prisms .

٣ ـ خلايا لوضع المحاليل الملونة وقد تكون أنابيب اختبار أو Cuvettes .

٤ ـ عنصر حساس ضوئيا Photosensitive قد يكون سيلنيوم متصل بجلفانومتر Galvanometer ، وقد تحتوي أجهزة أخرى على أنابيب باعثة للضوء كصمامات الراديو .

٥ ـ وسيلة مناسبة لقياس الخارج من العنصر الحساس ضوئياً وغالباً يكون عبارة عن الجلفانومتر .

المطياف Spectrophotometers يطلق اسم المطياف على أجهزة قياس اللون كهربيا ، والتي تسمح بقراءة الانطفاء Extinction على أطوال موجات مختلفة مستمرة ، وذلك في المدى المرئي وقرب التحت أحمر ، وقد يكون كذلك في المدى فوق البنفسجي ، فمنها ما يقيس على أطوال موجات ٢٠٠–٦٢٥ ، ٦٢٠–١٠١٠ نانومتر أو من ٣٦٠–١٠٠٠ نانومتر أو ٣٤٠–٧٥٠ نانومتر أو ١٨٥–١٠٠٠ نانومتر ، وأخيراً أمكن تدفق السائل لأجهزة قياس اللون كهروضوئياً دون وضعه في خلايا Cuvettes متحركة كبيرة ، بل الخلايا ثابتة ودقيقة وتمكن من القراءة اللونية المستمرة والسريعة .

ويلزم استخدام الخلايا الخاصة بالجهاز وعدم استخدام غيرها ، كما يلزم ضبط الجهاز على انطفاء صفر أي نفاذية ١٠٠ ٪ باستخدام بلانك قد يكون ماءً مقطراً أو مذيباً ، ثم

تحدد انطفاء محلول قياسي ثم انطفاء العينة ويحسب التركيز كالتالي :

تركيز المجهول (العينة) = قراءة الجهاز للعينة X تركيز المحلول القياسي

قراءة الجهاز للمحلول القياسي

ومن المعادلات التي تحول الكثافة الضوئية لنفاذية فعلية ؛ وضعت جداول لهذه العلاقة منها تستنتج مقياس بمعلومية الآخر .

وقد نلجأ لرسم منحنى قياسي Standard Curve لمحلول قياسي مختلف التركيز (العلاقة بين التركيز والكثافة الضوئية) لاستخدامه في حساب تركيز المادة المجهولة التركيز (العينة) بمعلومية كثافتها الضوئية وتوقيعها على المنحنى القياسي .

تحويل قراءة أجهزة القياس الضوئية من نفاذية ٪ (% Transmission) (%T) إلى كثافة ضوئية Optical Density (OD) .

%T	OD	%T	OD	%T	OD	%T	OD	%T	OD
1	2. 0000	21	0. 6778	41	0. 3872	61	0. 2147	81	0. 0915
2	1. 6990	22	0. 6576	42	0. 3768	62	0. 2076	82	0. 0862
3	1. 5229	23	0. 6383	43	0. 3665	63	0. 2007	83	0. 0809
4	1. 3979	24	0. 6198	44	0. 3565	64	0. 1938	84	0. 0757
5	1. 3010	25	0. 6021	45	0. 3468	65	0. 1871	85	0. 0706
6	1. 2218	26	0. 5850	46	0. 3372	66	0. 1805	86	0. 0655
7	1. 1549	27	0. 5686	47	0. 3279	67	0. 1739	87	0. 0605
8	1. 0969	28	0. 5528	48	0. 3188	68	0. 1675	88	0. 0555
9	1. 0455	29	0. 5376	49	0. 3098	69	0. 1612	89	0. 0506
10	1. 0000	30	0. 5229	50	0. 3015	70	0. 1549	90	0. 0458
11	0. 9586	31	0. 5086	51	0. 2924	71	0. 1487	91	0. 0410
12	0. 9208	32	0. 4949	52	0. 2840	72	0. 1427	92	0. 0362
13	0. 8861	33	0. 4815	53	0. 2757	73	0. 1367	93	0. 0315
14	0. 8539	34	0. 4685	54	0. 2676	74	0. 1308	94	0. 0269
15	0. 8239	35	0. 4559	55	0. 2596	75	0. 1249	95	0. 0223
16	0. 7959	36	0. 4457	56	0. 2518	76	0. 1192	96	0. 0177
17	0. 7696	37	0. 4318	57	0. 2441	77	0. 1135	97	0. 0192
18	0. 7447	38	0. 4202	58	0. 2366	78	0. 1079	98	0. 0088
19	0. 7212	39	0. 4089	59	0. 2291	79	0. 1024	99	0. 0044
20	0. 6990	40	0. 3974	60	0. 2218	80	0. 0965	100	0. 0000

حيث إن G عباره عن قراءة الجلفانومتر كنفاذية ٪

OD = 2. 000 - log G

معايرة جهاز Spectrophotometer :

يجرى تقدير معايرة جهاز الاسبكتروفوتومتر بغرض تعيين مدى دقته ، وتقدير معامل تصحيح لقراءاته ، وذلك بتقـدير التركيز لثـلاثة محاليل مـن ثاني كـرومات البوتاسيوم ($K_2Cr_2O_7$) في حمض الكبريتيك معلومة التركيز مسبقا (٠,٢٥ ، ٠,١٢٥ ، ٠,٠٦٢٥ ملليـمول) ، على طول موجة أعلى امتـصاص ٣٥٠ نانومتـر ، مع بلانك من حـمض الكبريتيك ٠,٠١٨ ع كمذيب وكونترول .تحسب مقدرة الامتصاص المولارية (E) على كل تركيز حيث إن :

E = (A x 1000) / Concentration mM

حيث إن A = قراءة الجهاز mM = التركيز بالملليمول للكرومات (Conc. mM) ،

وإن E= مول – امتصاص (Mol - Extenction) .

فتقدر (E) للثلاث تركيزات ، ويؤخذ متوسطهم للحصول على (E') ، فيحدد معامل التصحيح للجهاز (CF) من المعادلة :

CF = 3160 / E'

حيث إن ٣١٦٠ هو قيمة (E) لثاني كرومات معلومة .

فإن كان معامل التصحيح أصغر من ٠,٩٥ أو أكبر من ١,٠٥ فيختار جهاز آخر أو تكنيك آخر .

حمض الكبريتيك ٠,٠١٨ عياري عبارة عن ١ مل يد٢ كب أ٤ في ٢مل يد٢ أ .

ثاني كـرومـات بوتاسيـوم ٠,٢٥ ملليـمـول عـبـارة عن ٧٨مجم في لتـر يد٢ كـب أ٤ ٠,٠١٨ع.

ثاني كرومات بوتاسيوم ٠,١٢٥ ملليمول عبارة عن ٢٥ مل من المحلول السابق (٠,٢٥ ملليمول) مع ٥٠ مل حامض يد٢ كب أ٤ ٠,٠١٨ ع . أما محلول الكرومات ٠,٠٦٢٥ ملليمول فيخفف ٢٥مل من المحلول السابق (٠,١٢٥ ملليمول) مع ٥٠ مل يد٢ كب أ٤ ٠,٠١٨ ع .

وعند حساب التركيز الصحيح لمركب ما باستخدام معامل التصحيح (CF) للجهـاز ، ومعلومية الوزن الجزيئى للمركب (MW) والمقدرة الامتصاصية المولارية (E) له ، ثم قراءة الجهاز (A) تستخدم المعادلة :

Conc . ug / ml = (A x MW x 1000 x CF) / E

من المطياف ما يقيس في حدود ١٠٠–٨٠٠ نانومتر ، ومنه ما يقيس الطيف التحت أحمر Infra Red (IR) Spectra الناتج من الاهتزازات Vibrations الراجعة لتأثير الإشعاع على

الجزيئات ، فيحدث عدم نظام وإعادة توزيع الشحنات السالبة ، فيقيسها جهاز الأشعة تحت الحمراء ذو المناشير الصخرية Rock prisms ، لأن الزجاجية لا تنفذ الأشعة تحت الحمراء ، ومن هذه الأجهزة ما يستخدم في الطرق الفلورمترية Fluorimetric Techniques ، وهي حساسة جداً ، إذ تقيس تركيزات حتى ١٠-١٠ جرام / مل .

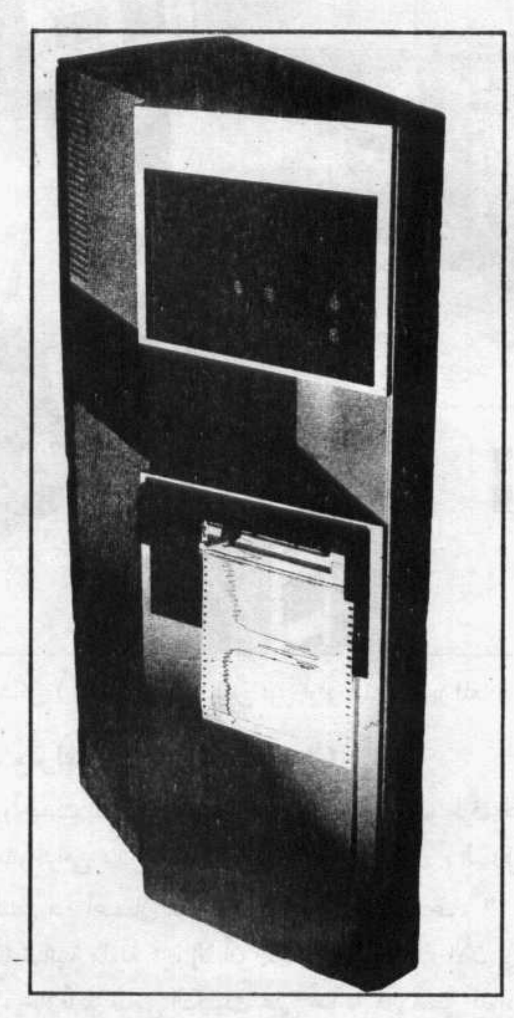
بعض الجزيئات تمر بحالة هياج Exciting أو حركة نتيجة حركة الكتروناتها ، وتزيد طاقتها ، وجزء من هذه الطاقة يكون كضوء فلورسنتي Fluorescent Light ، وهذه الأجهزة بها نفس مكونات الأجهزة السابقة من مصدر ضوء ووسيلة تحديد طول الموجة والخلايا للمحاليل ، وقد تعمل بالمرشحات (Fluorimeters) أو شبـاك انعطاف الضوء - (Spectrofluorimeters) والخلايا يجب ألا يكون لها فلورسنس ، فتستخدم خلايا من الكوارتز أو السليكا، ويقل الفلورسنس بارتفاع الحرارة ، كما يتأثر بتغييرات PH لإضرارها بالتأين ، ومن المطياف ما يستخدم في قياس الضوء الناتج من تركيز أيونات محلول تبخر في اللهب ، وهي طرق حساسة للغاية ودقيقة ، وتعطي نتائج حتى ١جزء في المليون ،كما في تقدير التلوثات المعدنية باستخدام مطياف الامتصاص الذري أو فوتومتر اللهب Flame or Atomic Absorption Spectro (AAS)Photometer ، ومطياف الامتصاص الذري أدق وأكثر ثباتاً من فوتومتر اللهب ، يستخدم فيها كمرشح أنبوبة ارجون أو نيون .

وتتم أكسدة العينة في غرفة قبل دخولها للهب باستخدام خليط الهواء والاستيلين (٢١٠٠-٢٤٠٠م) ، وتؤثر لزوجة المحلول على تبخره ، كما يؤثر عليها كذلك وجود السليكا ، أو المعادن القلوية ، لذا تعالج العينة بالـ Ammonium Pyrrolidine Dithocarba-mate لتجميع أي آثار من هذه المعادن ؛ ويتكون Flame Photometer من اللهب كمصدر ضوء ورشاش للعينة في صورة رذاذ للهب ، ومرشح مقياس حساس للضوء ، وطريقة لقياس الانبعاث المرغوب .

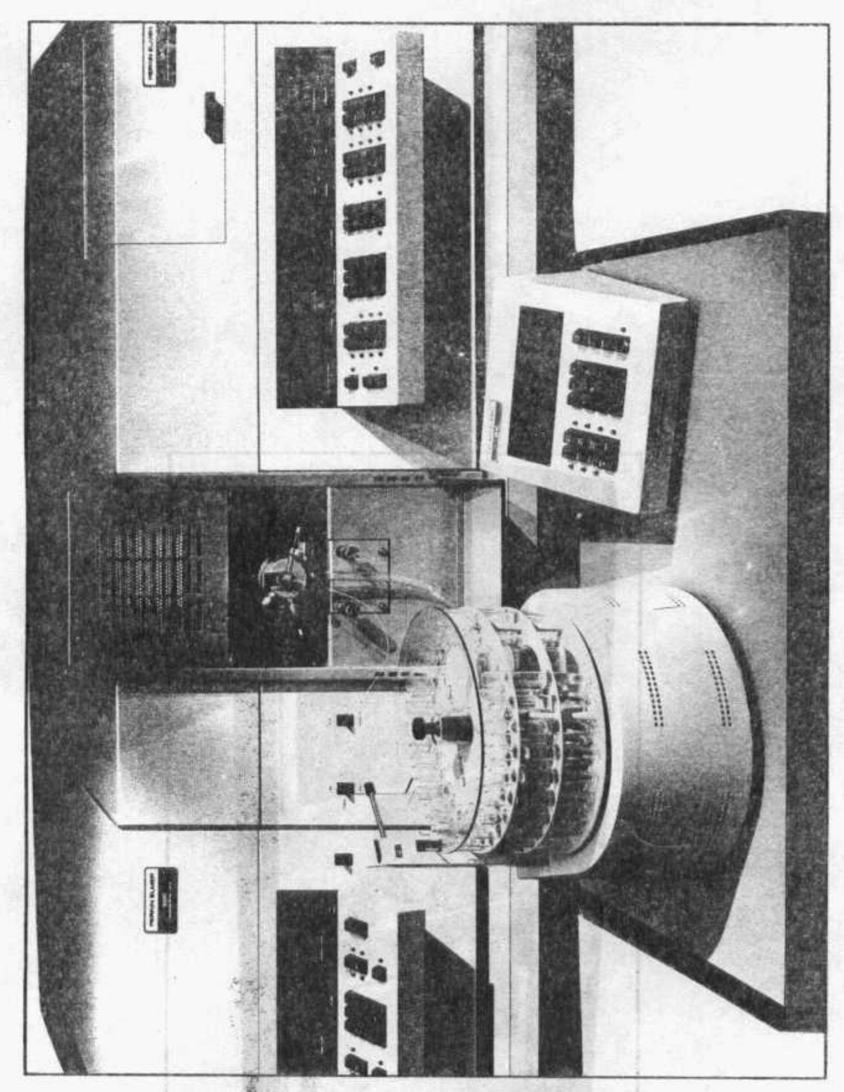
ومن هذه الأجهزة ما يقيس الفسفرة Phosphorimetry ، وهي ناتج انطفاء وتأين الذرات والجزيئات وهي شبيه بالفلورسنس ، إلا أن الأخير مرتبط بالانطفاء بدون تأين ، وبالفسفرة تفقد طاقة في صورة ضوء منبعث عند رجوع الأيون الثائر لحالته الطبيعية ، وانبعاث الفسفرة هو عمل تركيز الجزيئات النشطة إشعاعياً Radioactive .

أما مطياف الكتلة Mass Spectrophotometer يعطي معلومات تفيد في التعرف على العينة المختبرة ، فإزالة الالكترونات الخارجية في ذرة أو جزيء ينتج عنها أيون ذو شحنة موجبة تميز طيف الكتلة ، لإعطائها مركب قادر على التطاير على حرارة ٣٥٠م ، وعليه فيعطي طيف الكتلة المرسوم دلائل ويميز هذا المركب .

ويمكن لأجهزة القياس الكهروضوئية من تقدير العكارة Turbidimetry ، فالضوء



(شكل ١٠) إسبكتروفوتومتر أشعة تحت حمراء



(شكل ١١) مطياف امتصاص ذري أوتوماتيك لتقدير المعادن

١٩ ـ الكروماتوجرافي Chromatography :

واحد من أشهر وأحدث الطرق العلمية المتبعة في مختلف طرق التحليل ، ويشمل التكنيك طرق الكروماتوجرافى : الورقي ، رقيق الطبقة ، العمودى ، السائل ، الغازى .

ورغم أن الاسم اشتق من أعمال العالم الروسى Tswett فى عام ١٩٠٦ (فى فصل صبغات نباتية ملونة Chromatics) ، إلا أن التكنيك يستخدم الآن فى فصل مكونات عديدة عديمة اللون ، خلافاً لما سمى التكنيك على أساسه من فصل المواد الملونة .

ويعرف التحليل الكروماتوجرافى بأنه وسيلة لفصل مكونات خليط من المركبات العضوية أو غير العضوية ، نتيجة لاختلاف سرعة هجرتها فى النظامين (الوسطين) المكونين للكروماتوجرافى وهما النظام (الوسط) المتحرك Mobile Phase ، والنظام (الوسط) الثابت Stationary Phase ، وعليه فتتركز المركبات فى مناطق مختلفة ..

وقد تعددت طرق تقسيم وتصنيف الكروماتوجرافى وفيما يلى بعض طرق التقسيم هذه :

أولاً : يمكن تقسيم طرق التحليل الكروماتوجرافى طبقاً لقوى الفصل المستخدمة :

١ ـ فصل كروماتوجرافى بالادمصاص Adsorption Chromatography

٢ ـ فصل كروماتوجرافى بالتوزيع (التجزيئى) Partition Chromatography

٣ ـ فصل كروماتوجرافى بتبادل الأيونات Ion Exchange Chromatography

٤ ـ فصل كروماتوجرافى بالترشيح على الچيل Gel Filtration Chromatography

ثانياً : أمكن تقسيم الكروماتوجرافى من حيث صوره المختلفة الآتية :

١ ـ كروماتوجرافى غازى Gas Chromatography (GC)

١-١- كروماتوجرافى غاز ـ سائل Gas Liquid Chromatography (GLC)

١ ـ ٢ ـ كروماتوجرافى غاز ـ صلب Gas Solid Chromatography (GSC)

٢ ـ كروماتوجرافى سائل Solution Chromatography (SC)

٢-١- كروماتوجرافى عمودى . Column Chromatography

٢-٢- كروماتوجرافى تبادل أيونى .

٢-٣- كروماتوجرافى ترشيح بالچيل .

٢-٤- كروماتوجرافى ورقى. Paper Chromatography

٢-٥- كروماتوجرافى رقيق الطبقات . Thin Layer Chromatography (TLC)

ثالثاً : قسم الكروماتوجرافى حسب وسيلة العمل إلى :

١ ـ كروماتوجرافى ورقى .

٢ ـ كروماتوجرافى عمودى .

٣ ـ كروماتوجرافى رقيق الطبقات .

٤ ـ كروماتوجرافى غازى .

٥ ـ باستخدام الجهد الكهربى Electrophoresis

رابعاً : أمكن تقسيم الكروماتوجرافى من حيث نظامية المتحرك والثابت إلى :

نظام ثابت					صلب Solid (S)
	LSC	LLC	GSC	GLC	سائل Liquid (L)
نظام متحرك					غاز Gas (G)
					سائل Liquid (G)

١ـ كروماتوجرافى غاز ـ سائل Gas Liquid Chromatography (GLC)

٢ ـ كروماتوجرافى غاز ـ صلب Gas Solid Chromatography (GSC)

٣ ـ كروماتوجرافى سائل ـ سائل Liquid Liquid Chromatography (LLC)

٤ ـ كروماتوجرافى سائل ـ صلب Liquid Solid Chromatography (LSC)

خامساً : قسم برون Brown (١٩٧٣) نظم الكروماتوجرافى كما يلى :

١ـ غاز :

١ـ١ـ غاز سائل GLC

١ـ٢ـ غاز صلب GSC

٢ ـ سائل :

٢ـ١ـ سائل سائل LLC

٢ـ٢ـ سائل صلب LSC

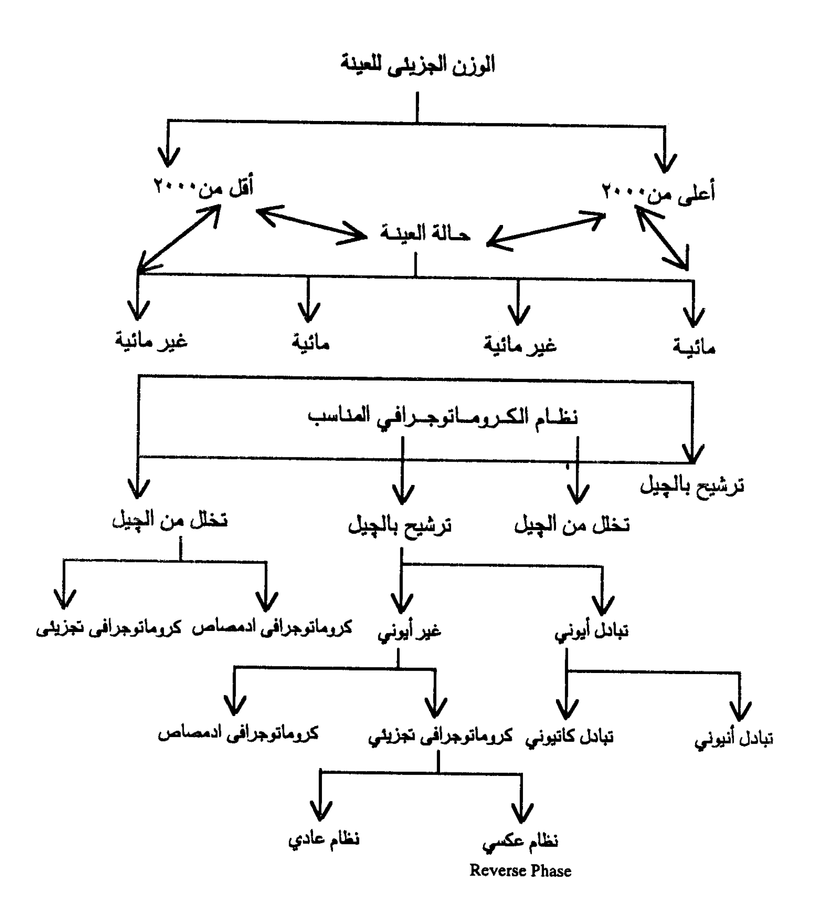
٢ـ٣ـ تبادل أيونى .

٢ـ٤ـ غربلة جزيئية . Molecular Sieving

٢ـ٤ـ١ـ ترشيح بالچيل .

٢ـ٤ـ٢ـ تخلل من الچيل . Gel Permeation

وقد قسم برون كذلك العينات التى سيتم تحليلها من حيث أوزانها الجزيئية ، وحالتها ، ونظام الكروماتوجرافى المناسب لها كما يلى :



وقد ذكر هوبر Huber (١٩٧٧) أنه لتحليل عينة ما كروماتوجرافيا ، فإن هناك اختياراً بين أربعة سبل مختلفة وهى :

١ ـ كروماتوجرافى إدمصاصى .
٢ ـ كروماتوجرافى توزيعى (تجزيئى) .
٣ ـ كروماتوجرافى تبادل أيونى .
٤ ـ كروماتوجرافى تخلل من الجيل .

واختيار أحد هذه الأنظمة يتوقف على تركيب مكونات العينة ، فمثلاً لفصل عينة من مكونات عضوية تختلف فى نوع وعدد المجاميع النشطة على الهيكل الكربونى لها فيمكن

استخدام النظام الأول أو الثانى ، فالنظام الأول (ادمصاصى) يمكن من فصل المواد المتناظرة التركيب Ismeric ، كما يمكن كل من النظام الأول والنظام الثانى (التوزيعى أو التجزيئى)من فصل المواد المتشابهة التركيب مختلفة الوزن الجزيئى ، بحيث يكون وزنها الجزيئى أقل من ١٠٠٠ ، ويستخدم النظام الثالث (تبادل أيونى) فى فصل المركبات كالأحماض والقواعد ، والنظام الرابع (تخلل من الچيل) يستخدم فى فصل المركبات مختلفة الوزن الجزيئى .

وتعتمد مقدرة الفصل لوسائل الكروماتوجرافى المختلفة على :

١ ـ مادة الادمصاص وتركيبها وحجم حبيباتها ومتوسط قطرها وتوزيع حجم الحبيبات ، وما قد تطلى به السطوح الخارجية للحبيبات من مركبات نشطة .

٢ ـ فى الكروماتوجرافى العمودى يتوقف الفصل على طول العمود ومساحة مقطعه (أبعاد العمود) ، أى رقم وارتفاع الأرضية ورقم الفصل ، كما يتوقف على المادة الحاملة (النظام الثابت) بالعمود ومدى ضغط حبيباتها والضغط الجوى الواقع عليه ، كذلك يتوقف على نوع خليط المذيبات المستخدم وبولاريته .

٣ ـ الكروماتوجرافى الورقى يلزمه اختيار نوع الورق المناسب من حيث مساميته وتركيبه الليفى وسرعة سريان المذيب فيه ، ومدى نقاوة الورق والمذيب ونظافتهم وخلوهم من الشوائب من دهون وبروتينات وأملاح وخلافها .

٤ ـ فى الكروماتوجرافى رقيق الطبقات TLC تتوقف القدرة على الفصل على سمك طبقة المادة الحاملة (مادة الادمصاص) أو النظام الثابت ومدى تجانس وانتظام سمك هذه الطبقة ، كما تتوقف على نوع هذه المادة ومواصفاتها الطبيعية والكيماوية ، وكذلك على نوع المذيبات المستخدمة فى تحميض العينة على الرقائق وبولارية هذا المخلوط من المذيبات وسرعة سريانه على الرقائق ، وكذلك على نسبة المسافة التى يسيرها المركب المراد تقديره منسوباً إلى المسافة التى يسيرها المذيب أو ما يسمى بسرعة السريان (^{R}F) Rate of Flow ، وهى نسبة ناتجها يتراوح بين الصفر والواحد الصحيح ، وإن عبر عن هذه النسبة كنسبة مئوية RF% فإنها تتراوح ما بين صفر – ١٠٠ .

٥ ـ الكروماتوجرافى السائل تتأثر نتائجه كذلك (بالإضافة لما يتعلق بالعمود) بدرجة حرارة الجهاز وسرعة سريان المذيب ونوعه ونوع Detector المستخدم سواء UV أو Fluorescence .

٦ ـ فى الغاز كروماتوجرافى تتوقف قدرة الفصل لمركبات عينة على نوع العمود وقطره وطوله ومادته المالئة ومواصفاتها وبرنامجه الحرارى الذى ستفصل عليه مركبات العينة، ومعدل تدفق الغازات الحاملة ، والغازات الكلية ونوع الـ Detector المستعمل .

٧ ـ كما تتوقف كفاءة الفصل عموماً على نوع المذيب Solvent المستخدم كمية ونوعاً ، وعلى نوع العينة وتركيز مكوناتها ، وطريقة تحويلها لصورة قابلة للتحليل بالتكنيك المنتخب الملائم ، ودرجة الحرارة كلما انخفضت زاد الادمصاص وكلما ارتفعت قل الادمصاص ، ومن أهم العوامل كذلك استبعاد وسائل التلوث المختلفة ، وذلك باتباع النظام الدقيق والنظافة التامة فى استعمال الأدوات والزجاجيات والأوانى والمحاليل وخلافه .

٨ ـ لدقة نتائج الكروماتوجرافى الورقى ورقيق الطبقات وأليكتروفوريسيس يستلزم أن يكون حيز التحميض مشبعاً بالمذيب .

وفيما يلى وصف لطرق التحليل الكروماتوجرافى المختلفة :

أولاً : التحليل الكروماتوجرافى بالادمصاص :

وتتم عملية الفصل بواسطة الادمصاص على مواد ادمصاصية مختلفة منتقاة ، سبق معاملتها ، توضع على صورة مسحوق فى أنبوبة رأسية زجاجية ، ثم يذاب المخلوط المراد فصله فى مذيب مناسب ويسمح له بالسريان من أعلى الأنبوبة إلى أسفلها ، مع تعريضه لضغط من أعلى أو إلى تفريغ من أسفل ، فالمادة التى لها ميل أكثر للادمصاص تدمص أولاً وتتركز فى المنطقة العلوية من الأنبوبة ، يليها المادة التى ميلها للادمصاص أقل ، حيث تتركز فى الطبقة التى تليها من أسفل ، فيمكن التعرف على هذه المناطق وفصلها عن بعضها ، والادمصاص يعنى زيادة تركيز المادة عند السطح ما بين الصلب والسائل ، أى أن الادمصاص على السطوح الصلبة لمادة الادمصاص Adsorpent ، وذلك تمييزاً عن الامتصاص الذى يعنى ذوبان المادة فى السائل . وكل مادة من مكونات الخليط تتعامل مع مادة الادمصاص بمفردها ، كلما قل حجم حبيبات مادة الادمصاص ، كلما زادت قدرتها على الادمصاص لزيادة المسطحات القادرة على الادمصاص ، وكلما قلت درجة الحرارة كلما زاد الادمصاص ، وذلك لقلة الحركة الجزيئية للجزيئات .

ويتم ادمصاص المواد القطبية Polar ، بينما لا تدمص المواد الغير بولارية Non Polar إلا إذا انخفضت درجات الحرارة ، هذا وتزيد قدره الادمصاص بزيادة تركيز المادة حتى تركيزات معينة ، بعدها لا يستجيب الادمصاص .

ثانياً : التحليل الكروماتوجرافى بالتجزىء (التوزيع) :

وفيه تستخدم كذلك مادة ادمصاصية مثل السليكاجيل ، مسحوق السليلوز ، أو النشا ، فى أعمدة (كروماتوجرافى عمودى) أو على الورق (كروماتوجرافى ورقى) ، وترطب مواد الادمصاص قبل إضافة مخلوط العينة عليها ، والمخلوط يكون مذاباً فى مذيب عضوى يمتزج جزئياً بالماء المرطب لمادة الادمصاص ، والفصل هنا راجع لاختلاف فى المعامل التجزيئى (التوزيعى) Partition Coefficient ، حيث يرجع فصل المواد المكونة لمخلوط العينة

إلى ذوبانها بكميات متفاوتة فى كل من المذيب الملتصق بمادة الادمصاص المؤدى لترطيبها (وهو غالباً الماء) وفى المذيب المنسكب ، حيث إن معامل التوزيع لكل من نظامى المذيبين يختلف بالنسبة لكل مادة ، وعليه فإن المواد الأكثر قابلية للذوبان فى المذيب العضوى تتركز فى أسفل الكروماتوجرام ، بينما المواد الأكثر قابلية للذوبان فى الماء تتركز فى المناطق العليا من الكروماتوجرام ، ويطلق على المادة الحاملة (مادة الادمصاص) والمذيب الملتصق بها بالوجه غير المتحرك أو النظام الثابت Stationary (Immobile) Phase ، بينما يطلق على المذيب العضوى للمخلوط بالنظام أو الوجة المتحرك Mobile Phase .

ويحسب معامل التوزيع (لمادة ما فى الخليط) بين نظامى الكروماتوجرافى المتحرك والثابت كالتالى :

معامل التوزيع Partition Coefficient (K)

$$= \frac{\text{التركيز الجزئي للمادة في النظام المتحرك}}{\text{التركيز الجزئي للمادة في النظام الثابت}}$$

$$\text{معامل التوزيع الفعال } (B) = \frac{\text{الكمية الكلية للمادة في النظام المتحرك}}{\text{الكمية الكلية للمادة في النظام الثابت}}$$

حيث إن $B = K \frac{V_m}{V_S}$

وإن V_m ، V_S هما حجما النظامين المتحرك والثابت على التوالى . ويتحكم الوزن الجزيئى ونوع جزيئات المادة فى كيفية توزيع جزيئاتها ، وإن كان معامل التوزيع واحداً نجد أن الكمية التى تذهب إلى كل من النظامين الثابت والمتحرك واحدة . فيؤدى اختلاف معامل التوزيع إلى تغيير فى مكان وجود المادة على الكروماتوجرام ؛ لذا فمن المهم فى اختيار المذيبات ومادة الادمصاص أن تعطى قيما متباينة لمعامل التوزيع للمواد الموجودة فى الخليط فيكون الفصل أوضح .

ثالثاً : التحليل الكروماتوجرافى بتبادل الأيونات :

وهو عبارة عن تحليل كروماتوجرافى بالادمصاص ، إلا أنه فى الادمصاص فإن الفصل يتم بالقوى الرابطة السطحية ، وهى غير قابلة لحمل شحنات Apolar ، بينما فى نظام تبادل الأيونات نجد أن الفصل يتم بواسطة قوى كهربائية كيماوية ، قابلة لحمل الشحنات polar وهى ترتبط برقم الحموضة PH ، إذ تتفاعل المادة الحاملة مع المادة المراد فصلها بفعل قوى كيماوية (توزيع تنافسى) ، يحدث فيها تبادل بين أيونات أو كاتيونات المحلول مع السطح الصلب للمادة الحاملة ، فينتج عن ذلك تركيز هذه المادة أو تلك ، وهذا النظام كسابقيه يطلق عليه كذلك كروماتوجرافى عمودى ، إذ تكون فيه المادة الحاملة معبأة فى أعمدة .

وتعرف السعة التبادلية بأنهاعدد الملليمكافئات من الأيون الممتص لكل ١٠٠ جم من

المادة الماصة ، وتختلف السعة التبادلية باختلاف المادة الممتصة ، فهى صفر لكربونات الكالسيوم ، وضعيفة فى معادن الطين ، ومرتفعة فى المبادلات التخليقية مثل الراتنجات المخلقة Synthetic Resins ، إذ تصل ٢٠٠-١٠٠٠ ملليمكافىء / ١٠٠جم . والأيونات المتبادلة تكون متكافئة أى أن كل وزن مكافىء / جم يمتص على السطح يخرج بدلا منه وزن مكافىء / جم من الأيونات الموجودة على السطح ، كما يحتفظ الأيون الممتص على السطح بشحنته الكهربائية ، وتتحرك الأيونات بحرية على سطح المبادل وهى متقيدة بنفس حركة المبادل نفسه ، فحركتها اهتزازية ، أو تأرجحية فى مدى معين ، ولكن ليست حركة انتقالية .

وتتميز المبادلات التخليقية Synthetic Ion Exchange Resins بقدرتها العالية جداً على التبادل ، وثبات عال على جميع قيم PH ، ودرجة حرارة تصل ١٠٠م ، وعدم القابلية الكلية للذوبان فى المذيبات العضوية ، وتتوقف هذه المزايا أساساً على طبيعة التركيب الشبكى والروابط المستعرضة Cross - Linked Skelton لهذه المبادلات .

وتحتوى الراتنجات ذات التبادل الأيونى على مجاميع فعالة حامضية مثل الكربوكسيل (COOH) أو الكبريتوز (HSO_3) ، أو قاعدية مثل الأمين (NH_2) ، وتسمى المبادلات ذات المجاميع الحامضية بالراتنجات ذات التبادل الكاتيونى ، تمييزاً لها عن الراتنجات ذات التبادل الأنيونى المحتوية على مجاميع قاعدية . ومن أمثلة الراتنجات ذات التبادل الكاتيونى Dowex - 50 ومن الراتنجات ذات التبادل الأنيونى Dowex - 1 .

ولتفهم عمل الراتنجات ذات التبادل الأيونى ، فإنه يمكن اعتبارهم مجاميع حامضية وقاعدية فعالة ومركبة وغير ذائبة ، فمثلاً عند إمرار محلول يحتوى على أملاح الأمينات فى أنبوبة محتوية على راتنجات ذات تبادل كاتيونى ، فإن هذه الراتنجات تأخذ كاتيونات الأمينات من المحلول لتحل محل كاتيون الهيدروچين منها ، ثم تسترد الأمينات الممتصة على سطح الراتنجات بغسلها بمحاليل أكثر حموضة فيمكن جمعها نقية ، كما يمكن الحصول عليها منفردة نقية عند غسل الراتنجات بمحاليل متفاوتة فى درجة الحموضة .

هذا ويستعمل فى التحليل الكروماتوجرافى بتبادل الأيونات مواد عضوية وغير عضوية ، فمن أمثلة المواد الغير عضوية سليكات الألومنيوم Zoelitte الطبيعية والصناعية ، ومنها كذلك أكسيد الألومنيوم القلوى والحامضى ، ويستخدم أكسيد الألومنيوم القلوى الشديد فى تبادل الكاتيونات ، وبمعاملته بزيادة من الحامض ثم الغسيل بالماء يصير متعادلاً بالنسبة لدليل أحمر كونغو Congo Red فينتج أكسيد الألومنيوم الحامضى ، فيكون مناسباً لتبادل الأيونات ، إلا أن مواد التبادل الأيونى العضوية أصبحت الآن هى المستخدمة فقط تقريباً فى أغراض التحليل الكروماتوجرافى ، وكلها مشتقات Derivatives من البوليستيرولات ، ويوجد

منها ثلاثة أنواع :

١ ـ مواد تبادل أيونى حامضية : وهى مواد تبادل كاتيونية لها القدرة على تحليل الأملاح (لشدة حموضتها) ، حيث يتحد الكاتيون مع مادة التبادل ، فى حين أن الأنيون يمكن إزالته فى صورة حامض مع ماء الغسيل ، ولهذه المواد سعة تبادل مقدارها حوالى ١,٤ مليمكافئ / ملليلتر .

٢ ـ مواد تبادل أيونى قلوية ضعيفة : وهى مواد تبادل للأنيونات لا تحلل الأملاح أو تحللها جزئيًا ، لها سعة تبادل مقدارها حوالى ١,٢ مليمافئ / ملليلتر .

٣ ـ مواد تبادل أيونى شديدة القلوية : تحلل الأملاح (لشدة قلويتها) حيث تتحد الأنيونات مع مادة التبادل بينما تخرج الكاتيونات (كقلوى حر) بالغسيل ، لهذه المبادلات سعة تبادل حوالى ٠,٧ مليمكافئ / ملليلتر .

ويمكن تنقية هذه المواد الثلاث وإعادة استعمالها باستخدام محلول ٦٪ HCl فى المواد الأولى ، ٥٪ NH_3 OH للمواد الثانية ، ٤٪ NaOH للمواد الأخيرة ، بنسبة ٣-٤ أحجام / حجم واحد من المادة يليها الغسيل بالماء المقطر ، وتستبعد المواد الغروية الممتصة باستخدام كحول ميثايل أو أسيتون .

المواد الممكن فصلها بالطرق الكروماتوجرافية :

١ ـ يجب أن تكون منتشرة سواء فى الصورة الأيونية أو الجزيئية ، وألا يحدث لها تجمع Coagulation مع بعضها ، وتكون قادرة على الانتشار فى نظام المادة المنتشرة الذى تم اختياره .

٢ ـ لو كانت فى صورة غازات ، أو لو أمكن تحويلها لمشتقات سهلة التحويل لغازات فيمكن فصلها بواسطة Gas Chromatography .

٣ ـ المواد الذائبة يمكن فصلها بواسطة Liquid Chromatography .

٤ ـ المواد غير الذائبة وغير الموجودة فى حالة طيارة Volatile ، أو المواد التى يحدث لها تكسير أو تغيير فى صفاتها الكيماوية وتتحلل بواسطة المذيبات المستخدمة فلا يمكن فصلها، وذلك مثل الأحماض النووية DNA ، RNA .

أجهزة الفصل الكروماتوجرافي

أولاً : التحليل الكروماتوجرافى الورقى Paper Chromatography :

أساس فكرة الكروماتوجرافى الورقى يمكن إيضاحها بافتراض أن نقطة من محلول لمخلوط من عدة مركبات قد وضعت على ورقة ترشيح (الوجه أو النظام الثابت

للكروماتوجرافى الورقى) وتركت لتجف ، وأن هذه الورقة قد غمس طرفها المحتوى على النقطة فى مذيب ما (نظام أو وجه متحرك) ، فإن المذيب سوف ينتشر لأعلى فى الورقة بالخاصية الشعرية ، أو لأسفل بفعل كثافته ، وعليه فإن مركبات نقطة المحلول سوف تنتشر مع المذيب على ورقة الترشيح إلى مسافات تتوقف على درجة توزيع كل منها فى المذيب . وهذه الطريقة تتبع نظام التحليل الكروماتوجرافى بالتجزىء (بالتوزيع) باستخدام الورق الذى يحل محل المادة الحاملة فى أعمدة الكروماتوجرافى بالتجزىء .

بعد سريان المذيب فى ورقة الترشيح مسافة مناسبة ، ترفع الورقة وتجفف ، وتعامل بمادة تترك لونا لتحديد مكان المركبات المختلفة فى المخلوط الأصلى ، وعلى هذا فسوف نجد أن هذه المركبات تقطع مسافات مختلفة ، وبذلك يحتل كل مركب وضعاً معيناً على الورقة فى اتجاه سريان المذيب ، ومن القواعد الواجب مراعاتها فى هذا الجهاز :

١ ـ ورق الترشيح المستعمل Paper :

ويتميز بالتركيب الليفى له ، وليس بتركيبه الكيماوى ، ويجب اختيار الورق الذى يتناسب مع طبيعة المادة التى يراد فصلها ، كما يجب إزالة أى شوائب بالورق ، وذلك بغسله بحامض هيدروكلوريك فتذوب الشوائب ثم تغسل بالماء ، كما يجب التخلص من الدهون بالورق بغسيله فى الإيثير ، والورق القياسى شائع الاستعمال هو Whatman 1 and Schleicher & Schull 2o346 ، وهو مصنوع من اللنترز Linters (أو السليلوز أو مخلوطهما) .

ويستخدم واتمان رقم (١) فى الأغراض العامة (هو مناسب كذلك فى Paper Electro-phoresis) وهناك كذلك الورق المصنوع من السليلوز ، فمنه S & S, no. 602 b والورق المصنوع من الصوف الزجاجى ، ومنه Whatman GF/A, GF/B , GF/C, S & S, no. 6,8

ومن الورق ما هو محب للماء Hydrophilic ويستخدم فى فصل المواد الدهنية .

وأبعاد الورق عادة أفرخ مقاس ٥٨×٥٨سم أو ٥٨×٦٠سم ، ويستخدم عادة فرخ الورق أو أشرطة منه أبعادها حوالى ٣×٥٠سم أو ٤٥×٥٥سم ويراعى عدم ملامسته لورق مستعمل أو لأدوات سبق استخدامها ، مع عدم مسك الورق إلا من الحواف لتجنب تلوثه ، كما يحفظ بعيداً عن أبخره المعمل .

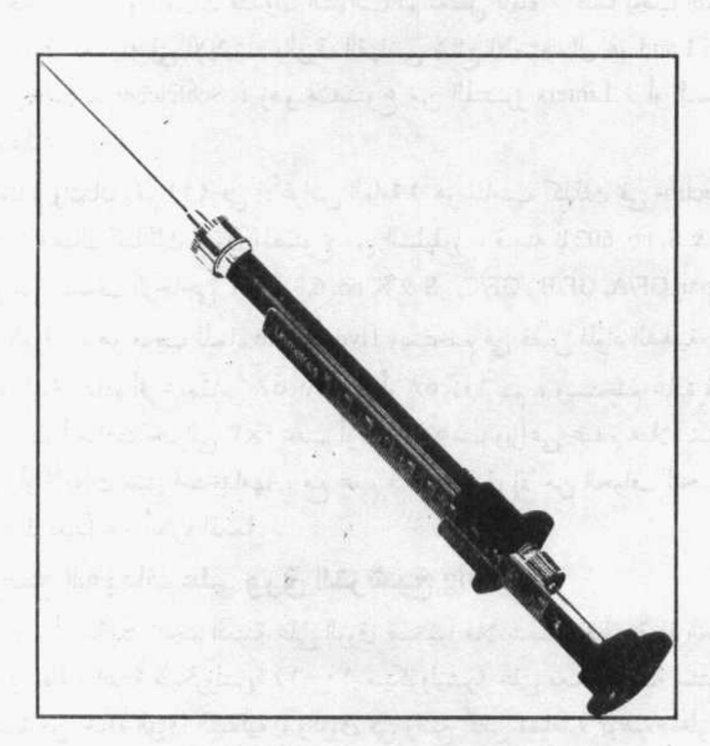
٢ ـ وضع العينات على ورق الترشيح Spoting :

من المهم أن يكون حجم العينة على الورق صغيراً فلا يتعدى قطر نقطة العينة ٥م ، وتوضع بواسطة ماصة ميكرولترية (١-١٠ ميكروليتر) على بعد بضعة سنتيمترات (٢-٥سم) من حافة الورق السفلية ، والورق فى وضع أفقى تماماً (بوضعه على لوح من الزجاج) ، وذلك برسم خط بالرصاص على بعد على الأقل ٢,٥سم من الحافة السفلى

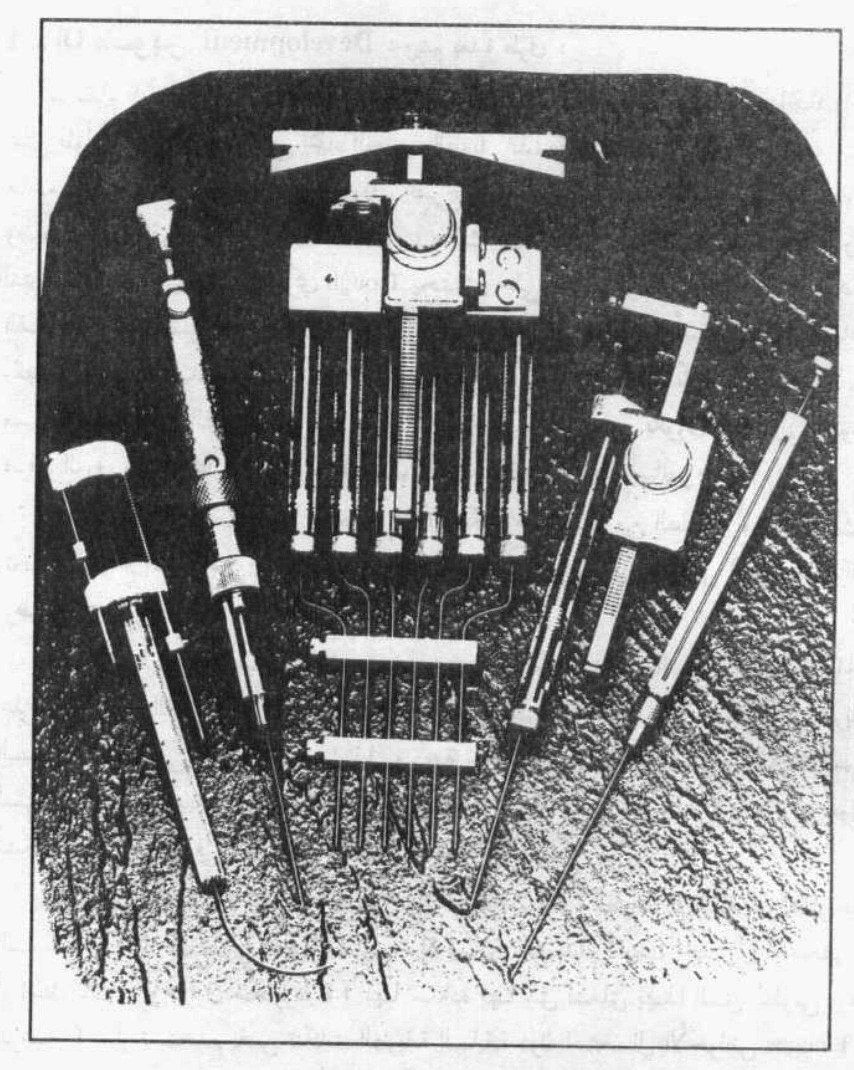
يسمى خط الابتداء ، توضع عليه نقط محاليل العينات ، تترك النقطة لتجف بالأشعة تحت الحمراء ، أو بالهواء الساخن ، والأفضل بهواء الغرفة ، وإذا لزم الأمر وضع العينة على دفعات فيجب أن تجفف بعد كل إضافة ، والمسافة بين كل نقطتين ٢,٥ سم ، ويراعى خلو العينة من الأملاح ؛ لأنها تتدخل فى عملية الفصل ، فتزال بالتبادل الأيونى أو بالطرد المركزى العالى أو اليكتروليتيا Electrodialysis ، كما يجب أداء تجارب مبدئية لانتخاب أنسب أنواع الورق ومخلوط المذيب .

٣ ـ تحضير العينة Preparation of Sample :

العينات الصلبة تذاب فى مذيب عضوى مناسب منخفض فى درجة الغليان مثل الأسيتون ، إيثانول ، كلوروفورم ، تركيز العينة فى المذيب يكون على الأقل ٠,١ - ١,٠ ٪ ، وتكون كمية المادة المختبرة ١ - ١٠٠٠ مجم ، وهذا يتوقف على حساسية الطريقة المستعملة وكذلك على الغرض من التحليل . هذا ولابد من استخلاص وإزالة الشوائب Removal of Ballast من العينة ، لما لهذه المواد من تأثير غير مرغوب على التحليل الكروماتوجرافى ، وعلى الأخص منها البروتين ، الليبيدات ، الأيونات غير العضوية .



(شكل ١٢) سرنجة سعة ١٠ ميكرولتر للاستخدام الكروماتوجرافي



(شكل ١٣) نماذج لسرنجات ميكرولترية تستخدم في حقن أجهزة الكروماتوجرافي

وقد نلجأ لتحضير مشتقات للمركب المراد تقديره وذلك فى بعض الحالات مثل :

أ ـ المواد الطيارة تحول إلى صورة غير طيارة (كحولات ، الدهيدات ، كتيونات) .

ب ـ المواد التى لايمكن ملاحظتها على الورق الكروماتوجرافى لكن يمكن ملاحظة مشتقاتها Derivatives .

جـ ـ فى حالة المشتقات التى يسهل فصلها على الورق عن المادة الأصلية .

٤ - **التطوير Development** : ويتم بعدة طرق :

أ - نظام السريان الهابط Descending : وفيه يسمح للمذيب بالسريان فى اتجاه واحد على طول ورقة الترشيح (فى اتجاه الجانب الطويل الذى يكون عنده انسياب المذيب أسرع ما يمكن وهو اتجاه السهم على حواف الفرخ ، أو اتجاه الطرف البيضاوى لنقطة ماء إذا وضعت على الفرخ) إلى الاتجاه السفلى ، وذلك نتيجة وضع الطرف الأعلى لشريط الورق الذى به نقطة العينة فى مجرى Trough يحتوى على المذيب ومعلق فى حوض محكم القفل ، وعند فصل مواد بطيئة الحركة يمكن شرشرة الورقة من أسفل لزيادة مساحة مقطعها وسهولة تساقط المذيب . هذه الطريقة هى الأكثر شيوعاً واتباعاً وفيها يقطع المذيب مسافة طويلة فيتم الفصل أسرع ، وجود أيونات حديد أو نحاس بالورق يؤدى إلى اسوداد طرف الورق المنتشر عليه المذيب ، ولتجنب ذلك يضاف ٠,١ جم سيانور صوديوم .

والأحواض عادة تصنع من الزجاج إلا أنه ممكن صناعتها من الصلب أو البلاستك ، وتختلف أنواع الأحواض أو التنكات Tanks باختلاف الغرض من الفصل الكروماتوجرافى وطريقة التطوير .

ب - نظام السريان الصاعد Ascending : وفيه يسمح للمذيب بالسريان فى اتجاه واحد على طول ورقة الترشيح إلى الاتجاه العلوى ، وهذه الطريقة تعطى نتائج أحسن من الطريقة السابقة وأبسط فى الأداء ، وفيها تقل سرعة سريان المذيب عادة بعد مسافة ٢٥سم ، لسريانه ضد الجاذبية الأرضية ؛ لذا توقف عملية التحميض عند هذا الارتفاع ، وفيها تشكل ورقة الترشيح فى صورة اسطوانة قطرها عادة ١٥سم .

يحدث اسوداد مقدمة المذيب المنتشر على الورقة كما فى الطريقة الهابطة ، وتمتاز هذه الطريقة أنها لا تحتاج إلى جهاز معين ، إذ يمكن استخدام أنابيب اختبار ، أو مخابير ، أو اسطوانات ، أو دوارق مخروطية (لها سدادة بها شق لتعلق بهذا الشق الطولى ورقة الترشيح) ، أو تستخدم نفس تنكات الطريقة السابقة دون استعمال الأحواض Troughs ، وتعلق الورقة بالعينة خلال الغطاء أو يمكن إيقافها على قاع التانك أو بإدارتها على اسطوانة ممسوكة معاً بمشابك بلاستك .

جـ - الكروماتوجرام المستمرة : وهى طريقة شبيهة بالطريقة الهابطة ، لكن يستمر المذيب فى الانسياب إلى ما بعد نهاية الورق لمدة ٤٨-٧٢ ساعة ، وذلك للفصل الجيد للبقع فى حالة انخفاض قيمة R_F ، وهنا لايمكن تقدير R_F ، بل يعمل كروماتوجرام مقارنا للمادة المتوقعة ، وتقاس المسافة التى قطعتها المادة المعلومة وبقسمة المسافة التى قطعتها المادة المجهولة على المسافة التى قطعتها المادة المعلومة تستخرج قيمة R_g ، وفى هذه الطريقة لايسود طرف الورقة .

د ـ الطريقة الصاعدة الهابطة : وهى خليط بين الطريقتين الهابطة والصاعدة ، إذ تعلق الورقة على قضيب زجاجى بحيث يغمر الطرف الأول فى المذيب فيصعد بالخاصية الشعرية، ثم يمر على القضيب ، ثم يهبط فى الطرف الآخر .

وهذه الطرق الأربعة كلها فى اتجاه واحد ، أى أن المذيب يسير فى اتجاه واحد - One Dimensional .

هـ ـ أن يتم سريان المذيب فى اتجاهين Two - Dimensional : وذلك فى مخلوط مركبات معقد باستخدام مذيبين مختلفين أحدهما قاعدى والآخر حامضى ، وفيها يكون الورق مربعا عادة ٢٠×٢٠سم أو أكبر فيطور فى المذيب الأول ثم يجفف ويدار بزاوية ٩٠ ويطور فى المذيب الآخر .

و ـ النظام الأفقى Horizontal Development : وهو المستخدم حديثا ؛ لأنه يحتاج مسافات قليلة ، ويمكن للتانك من وضعه بسهولة فى المجففات أو الحضانات أو المبردات ، والتانك يصنع من زجاج ضحل ؛ ويوضع الكروماتوجرام أفقياً على قضبان زجاجية أو على ألياف صناعية .

فى النظام الأفقى يمكن وضع الورق بين لوحين من الزجاج أو الألومنيوم ، وخاصة فى حالة المواد المتطايرة كالفينولات ، ومن طرق التطوير الأفقى كذلك استخدام كروماتوجرام حلقى أو دائرى أو ما يسمى بالتطوير المتشعع ومنه :

١ ـ طريقة روتر Rutter : بعمل قطعين متوازيين على ورق ترشيح مستدير من المحيط ومتجهين إلى المنتصف ، ثم يثنى الشريط الناتج إلى أسفل بطول مناسب ، وتوضع نقطة من العينة المراد فصلها فى مركز الورقة ، ثم تجفف ، ويوضع طرف الشريط فى المذيب الموجود فى طبق تبرى ويغطى بطبق آخر فتتكون بقع على هيئة دوائر مركزية .

٢ ـ طريقة تسمرمان ونيرنج Zimmermann & Nehring : فتوضع ورقة ترشيح مستديرة بين مجفف زجاجى وبين غطائه المزود بفتحة ، فتوضع نقطة العينة فى مركز الورقة وتجفف ، ثم تسد فتحة غطاء المجفف بسدادة ينفذ منها سحاحة طرفها السفلى مسحوب شعرى بحيث تنقط ١٠-١٢ نقطة مذيب فى الدقيقة ، فتتكون البقع على هيئة كروماتوجرام حلقى أو بيضاوى ضعيف ، وهى طريقة سريعة ، وتحدد فيها قيمة RF بدقة ، ويقدر التركيز كميا باختبار فوتومترى للشريط .

٣ ـ طريقة بولرد Pollard : توضع فيها ورقة الترشيح المستديرة بين قرصين من الزجاج، مزود العلوى منها بثقب وتوضع نقطة العينة فى المركز وتجفف وتحمض .

٥ ـ اختيار مذيب التطوير Developing Solvents :

يستخدم عادة مذيبان أو أكثر من المذيبات العضوية ، ويراعى فيها أن تتحرك ببطء

لتعطى نقطًا مستديرة أقل انتشارًا ، ويتحكم كذلك نوع الورق (مساميته) المستعمل فى اختيار نوع المذيب .

ومن أشهر المذيبات المستخدمة مخلوط Partridge ، وله رقم حموضة PH ٢,٩ ، ويتكون من البيوتانول : حامض الخليك ٩٦٪ : ماء بنسبة ٤ : ١ : ٥ ، ويختلف نوع المذيب باختلاف المواد المفصولة ، وتختلف نسبه حسب سرعة الفصل ، يعتمد الفصل بالتجزىء على معامل التجزئة بين مكونات خليط المذيبات ، وقد رتبت المذيبات العضوية (من حيث تكوينها لروابط هيدروچينية) فى قائمة كبيرة ، على رأسها المذيبات التى تعمل كحامل أو مستقبل لزوج الكترونات مكونة كبارى من الهيدروچين بين الجزيئات ، أى أنها محبة للماء Hydrophopic أو مذيبات قطبية Polar Solvents ، وفى نهاية هذه القائمة نجد المذيبات التى لا تتوفر فيها هذه الصفة ، أى أنها غير محبة للماء Hyrophobic أى محبة للدهون Lipophilic أو مذيبات غير قطبية Nonpolar Solvents ، فتمتزج المذيبات القطبية مع الماء ، أما غير القطبية فتكون طبقتين منفصلتين ، وفيما يلى قائمة المذيبات العضوية طبقًا لقطبيتها :

الماء ــ فورماميد ــ ميثانول ــ حمض خليك ــ إيثانول ــ أيزو بروبانول ــ اسيتون ــ بروبانول ــ فينول ــ بيوتانول ــ كحول إميل ــ خلات إثيل ــ إيثير ــ خلات بيوتيل ــ كلورفورم ــ بنزين ــ تولوين ــ هكسان حلقى ــ إيثير بترولى ــ بترول ــ زيت برافين .

هذا ويجب أن يتوفر فى المذيبات المستخدمة فى الكروماتوجرافى :

١ ــ أن تقوم بإذابة المواد المطلوبة .

٢ ــ أن تسمح بحدوث عملية الادمصاص الديناميكى ؛ لأنه لو لم تكن هكذا فإن الفصل لن يحدث .

٦ ــ التعرف على البقع (إظهارها) Identification :

فى العادة تجفف الورقة لإزالة آثار المذيب ، ثم تتم عملية إظهار البقع بغمر أو رش الورقة بمادة كيمائية تتفاعل مع المركبات المنفصلة لتعطى لونًا ، وطريقة الغمر أفضل ؛ لأنها لاتحدث رائحة نفاذه ؛ ولأنها اقتصادية ، ويتم الرش بواسطة زجاجة لها ثقوب صغيرة جدًا ، أو زجاجات الضغط الهوائى Atomizers or Aerosol Sprays ويفضل أن يكون فى خزانة الغازات ، والرش لابد وأن يتم ببطء وبتجانس ، ومع ملاحظة ألا تحمل الورقة بأكثر من اللازم ؛ لأن الرش الكثيف يؤدى إلى انتشار وهجرة البقع .

ويتم التعرف على المركب المراد فصله بتحديد RF له ومقارنتها بقيمة RF للمحلول القياسي المعلوم Standard لنفس المركب ؛ وذلك لأن قيمة RF ثابتة للمركب الواحد لا تتغير في الظروف الثابتة ، وقيمة RF هذه عبارة عن عامل يتوقف على درجة توزيع المركب في المذيب ونوع المذيب المستخدم ودرجة الحرارة ؛ لذلك فإن استخدام RF في تحديد المركبات لايكون دقيقاً إلا تحت الظروف المحكمة ، وتقارن RF للمركبات تحت نفس الظروف .

بعد تحديد مكان المركب بقلم رصاص ، يتم تقديره كميا بقياس مساحة بقعة المركب، حيث يتناسب حجم البقع مع لوغاريتم تركيز المركب ، وبناء على ذلك فإن محلولي نفس المادة الذين يحتلان نفس المساحة يكون لهما نفس التركيز (± ١٠٪ نسبة خطأ) ، وقد يمكن تقدير مساحة البقع بإجراء كروماتوجرام لمحاليل مختلفة ومعلومة التركيز ، وتقارن البقع المتكونة بالبقعة الخاصة بالتركيز المجهول ، وتقدر مساحة البقعة إما بالقياس أو بقطعها ووزنها ، وقد تستخدم الطرق الضوئية Photometric لتقدير تركيز البقع ، فتغمر الورقة لمدة ٥ دقائق في مخلوط من الفا ـ برومونفثالين Alfa - Bromonaphthalin مع البرافين السائل والـ DAB بنسبة ١ : ١ : ١ حيث يصير الورق شفافًا ، وبعد التجفيف تقاس البقع بمساعدة جهاز فوتومتري لقياس الكثافة الضوئية ، أو أن تستخلص بقعة المركب ، وتقدر كثافة اللون وبالتالي التركيز في المستخلص بواسطة جهاز مناسب لقياس الألوان Colorimeter .

وقد يكشف عن المركب بفحص الكروماتوجرام بالنظر في الضوء المرئي (للمركبات الملونة) ، أو باستخدام الضوء فوق البنفسجي (بعد تبريد أو تسخين الكروماتوجرام) ، أو بالطبع لتسجيل موقع البقع ، أو باستخدام طرق الكشف الإنزيمية أو البيولوجية ، أو تستخلص البقع وتقدر كميا بوسائل فوتومترية ، وقد يستخدم الاستقطاب أو الامتصاص أو قياس الإشعاع كوسائل للتقدير الكمي للمركبات المفصولة .

وقد يتبع في الكروماتوجرافي الورقي التطوير العديد أو المضاعف Multiple Development، بتكرار التطوير في نفس الاتجاه أكثر من مرة لتمام فصل مركبين أو أكثر ارتبطا معا بقيم RF واحدة ، باستخدام نفس نظام المذيبات أو أنظمة أخرى ، وقد يستخدم التطوير في اتجاهين ، وهو كالنظام السابق مع فارق أن ورق الكروماتوجرام يكون مربعاً ، والعينة توضع في أحد الأركان ، والتطوير الثاني في اتجاه عمودي على اتجاه التطوير الأول ، مع اختلاف نظام المذيبات في كلا الاتجاهين .

إذا أعطى النظام المستخدم في التطوير قيم RF منخفضة (٠,٠٢ – ٠,٢٠) ، فإنه يجرى تطوير آخر بعد قصقصة الطرف السفلي للورق في شكل أسنان المنشار Saw Tooth Fashion (بين كل سنة وأخرى ٢سم عرض) ، وتطور تنازليًا أو بالطريقة الهابطة Descending

ويستمر التطوير حتى بعد بلوغ المذيب للنهاية السفلى للورق لبعض الوقت .

ولحفظ الكروماتوجرام فإن بقع المواد مع النهيدرين Ninhydrin تتفاوت في ثباتها ، فتختفي بقع الأحماض الأمينية مع النهيدرين في ظرف ٢-٣ أيام ، لذا فترش للتثبيت بمحلول نترات نحاس ، أما بقع السكريات فتدوم لمدة أطول .

ومن الجدير بالذكر أن مولد الكروماتوجرافى الورقي جاء نتيجة أبحاث الكيماويين الإنجليزيين (١٩٤١-١٩٤٤) باستخدام ورق الترشيح كوسط حامل ، ونتيجة هذا الاكتشاف حصل العالمان الإنجليزيان Martin & Synge على جائزة نوبل للكيمياء عام ١٩٥٢ .

ثانيًا : التحليل باستخدام الجهد الكهربي Electrophoresis :

يحتمل أن يكون الإليكتروفوريسيس هو أقدم أشكال التحليل بالهجرة Migratory Analysis ، خاصة أن هذا التكنيك هو ألطف الطرق معاملة بالمواد التي يفصلها ، وقد تعددت استعمالاته في نهاية القرن التاسع عشر ، فقد أثبت Kendall (١٩٢٣-١٩٢٨) في دراسته للخواص الكهربية للغرويات إمكانية تحليل القلويدات والأراضي الخفيفة بواسطة الإليكتروفوريسيس ، كما تمكن Tiselius من تطوير أول طريقة لفصل البروتين بالإليكتروفوريسيس ، ومن ١٩٤٨ فصاعداً وفي ظل التطور السريع للكروماتوجرافي نشأت اقتراحات بتثبيت الكتروليتات للإكتروفوريسيس على موصل ثابت .

الإليكتروفوريسيس (سمى قديماً Cataphoresis) يشير إلى حركة الجزيئات المشحونة Charged Particles في حقل كهربي ، بينما يشير الأيونوفوريسيس Ionophoresis إلى حركة الأيونات الصغيرة Small Ions ، ويعمل الإليكتروفوريسيس في وسط حر أو مرتبط ، وهو شديد الارتباط بالتوصيل الكهربي في الإليكتروليتات ، وقد اقترح Debye & Hückel تصوراً لسلوك الإلكتروليتات القوية عند انخفاض التركيزات ودعم هذا الاقتراح بقوانين الهجرة للإكتروفوريسيس .

ورغم أن أيونات المحلول الإلكتروليتي تنجذب للأيونات ذات الشحنات المخالفة وتتنافر مع الأيونات ذات الشحنات المماثلة ، فإن التنشيط الحراري يؤدي لعشوائية توجيه الأيونات في الوسط الكهربي .

ويشترط في الوسط الارتكازي المثالي أن يكون شفافاً ذا خواص ميكانيكية لتسهيل التناول ، وأن يكون رخيصاً وغير سام وثابتاً ، وقد يكون في صورة شرائط Sheets أو حبوب Granules أو جيل Gels ، والأشرطة قد تكون ورقاً (Paper Electrophoresis) أو أغشية من(Cellulose Acetate) ، وتمتاز هذه الأوساط بارتفاع نسبة المسطح إلى الحجم ، أما الحبوب أو الأوساط المحببة فقد تكون من مسحوق السليلوز Cellulose Powder ، أو مسحوق

كلوريد عديد الفنيل Poly Vinylchloride Powder ، أو نشا محبب Granular Starch وكلها تجهز في شكل كتل أو مكعبات ، والجيل يوجد منه Silica Gel وكذلك Agar Gel والنشا وأيضاً Polyacrylamide Gel .

وقد استمر استخدام اصطلاح التحليل اللوني الكهربي Electrochromatography للإشارة إلى التحليل بالتفريد الكهربي Electrophoretic Procedures ، سواء الورقي أو العمودي (منذ عام ١٩٤١) ، وهو لصيق الصلة بالتبادل الأيوني والكروماتوجرافى رقيق الطبقة .

وأهم تكنيك هو التفريد الكهربي الورقي ؛ لأنه الأكثر انتشاراً ، ويتركب جهاز التفريد الكهربي من أهم جزء وهو شرائط الورق Strips of Filter Paper ، وغالباً تكون مقاساتها ما بين ٣٠-١٠٠سم طول ، ٣-١٥سم عرض . تبلل الشرائط هذه بمحلول إليكتروليتي . وكمية هذا المحلول الممتص في حالة التفريد الكهربي عالي الجهد الكهربي High - Voltage Electrophoresis تساوي تقريباً الوزن الجاف للشرائط ، بينما تتضاعف الكمية في حالة انخفاض الجهد، وتمتص شرائط Acetylcellulose أو Thin Layers of Cellulose Powder حوالي ٤ أضعاف وزنها من المحلول المنظم Buffer .

توضع العينة المختبرة فى شكل خط Streak في الزاوية اليمنى للمحور الأطول للشريط ، ثم يسمح بمرور الجهد الكهربي للنهايتين .

وسواء كان الجهد المنحدر المستعمل عالياً (٥٠-٢٠٠ فولت / سم طول شريط) أو منخفضا (٢-١٠ ف/سم) ، فإنه يعتمد على طبيعة المادة المختبرة ، وكقاعدة عامة فإنه يمكن القول بأن المواد ذات الوزن الجزيئى المنخفض تنفصل أفضل عند منخفض جهدي عال ، بينما المواد مرتفعة الوزن الجزيئى يناسبها انخفاض منحدر الجهد .

ومن جهة أخرى ، فإن المواد مرتفعة الوزن الجزيئى تنتشر ببطء جداً ، وعليه فالهجرة السريعة غير مناسبة ، علاوة على أن أكثر المواد مرتفعة الوزن الجزيئى يعيقها ورق الترشيح عن الهجرة بارتفاع الجهد ، وتسبب ضعف الفصل ؛ لذا يفضل معها استعمال الجهد المنخفض .

والتفريد الكهربي باستخدام ورق الترشيح والمواد الشبيهة له نظامان ، إما باستخدام :

١ ـ التفريد الكهربي بارتفاع الجهد الكهربي :

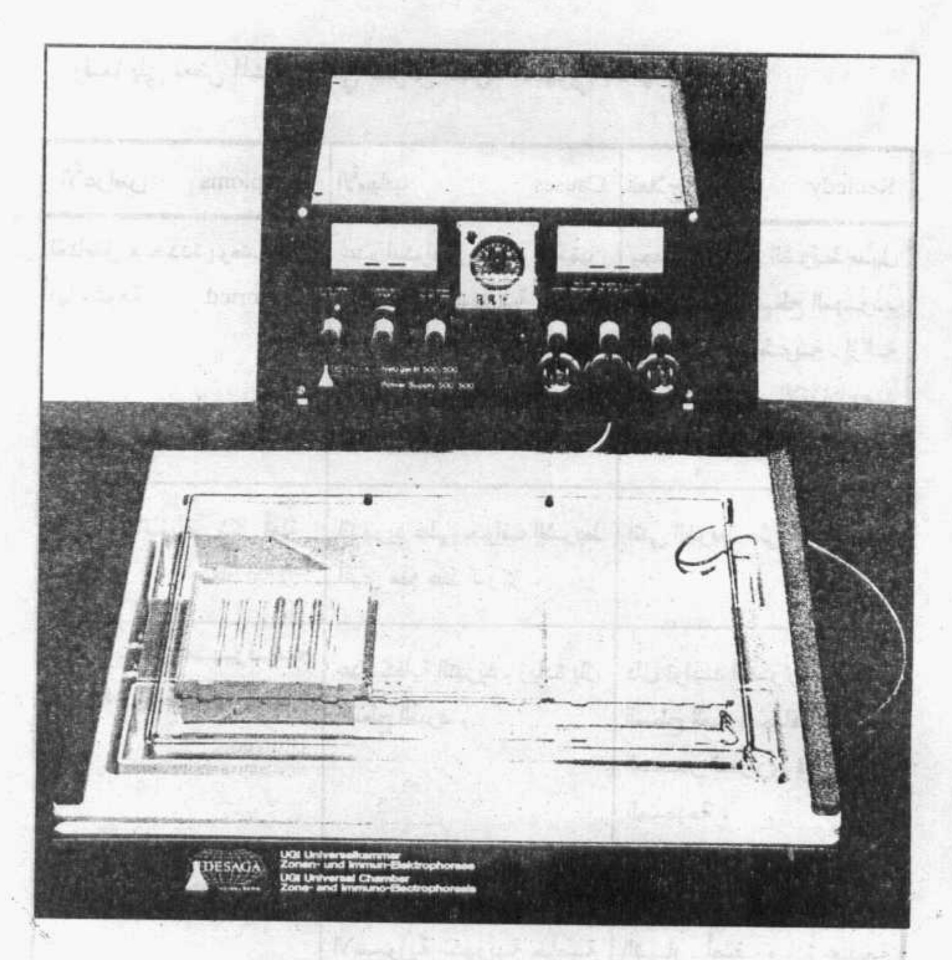
High-Voltage Electrophoresis

رغم أن هذا النظام أدخل حديثاً إلا أنه واسع الانتشار حالياً . وسنكتفي بأمثلة مختارة للتطبيقات عليه .

تزداد نسبة الهجرة أو السريان للأيونات بزيادة خطية زيادة المنحدر الجهدي ، لكن تؤدي

الحرارة لزيادة مضاعفة ، وعليه فعندما يزيد المنحدر الجهدي من ٥ ڤولت / سم إلى ١٠٠ ڤولت / سم فإن المناطق ستهاجر أسرع عشرين ضعفاً ، لكن كمية الحرارة الناتجة في الشريط ستزيده إلى ٤٠٠ مرة ، فزيادة الحرارة ١ْ م تزيد الهجرة بمعدل ٣٪ . ولتجنب التشويش في المناطق Zones فإنه يجب انتقال الحرارة بتجانس وتماثل خلال كل مساحة الشريط وألا تزيد الحرارة في مكان ما . بانخفاض الحرارة تزيد اللزوجة للمحاليل الإلكتروليتية مما يتطلب منحدر جهدي عال للتغلب على هذه الظاهرة .

الأجهزة ذات المبادلات الحرارية الصلبة Apparatus With Solid Heat Exchangers في هذا النظام من الأجهزة تنتقل الحرارة إلى صفائح باردة لها خاصيتان ، إذ تمتاز بالتوصيل الحراري الجيد Good Thermal Conductivity مع رداءة توصيلها الكهربي Electrical Insu-lators ، ومنها الزجاج والبلاستك (وإن كان البلاستك أسهل في استعماله إلا أنه يميل لارتفاع الحرارة في بعض المواضع) ، والجهاز مكون من رقيقة معدنية معزولة كهربياً ويسري تحتها ماء جار أو ماء ملح مبرد (بواسطة سربنتينة) ، وعليها رقيقة زجاج سليكون مثبتة إليها وعليهما رقيقة أخرى من الزجاج ، وبين رقيقتي الزجاج يوضع شريط ورق الترشيح ، وفي نهاية السطح البارد يوجد إناء المحلول المنظم المتصل بالإلكترودين (نحاس / كلوريد نحاس) بواسطة قنطرة ، وكل هذه المكونات في إناء بلاستك ، ويحتاج هنا إلى مصدر تيار مناسب يفضل ١٠٠٠٠ ڤولت على ١٠٠ ملي أمبير ، وفي بداية التجربة توضع شريط الورق المبلل على رقيقة الزجاج ، ثم يوضع عليها المادة المختبرة ، ثم يوصل شريط الورق وإناء المحلول المنظم بالتيار من خلال قطع أنابيب سلوفان مزودة بفتيل Wick من ورق ترشيح مبلل بمحلول منظم ، ويغطي شريط الورق برقيقة الزجاج الأخرى ، وتملأ أواني الإلكترودات والقناطر بالمحلول المنظم ويغطي الجهاز بالغطاء ويوصل التيار .



(شكل ١٤) جهاز تفريد كهربي (إلكتروفوريسيس)

ولبلل الورق أهمية تسهيل اتصال المحلول المنظم بالسطح المبرد ، ويجب أن تكون نسبة وزن الشريط الجاف إلى المحلول المنظم ١ : ٢-٢,٥ .

والبلل لازم لتعريض شريط الورق للضغط أو الكبس أو العصر ، إذ يصل الضغط في الجهاز إلى ١٥ رطل / البوصة المربعة .

وفيما يلي بعض المشاكل التي تعترض التفريد الكهربي بالجهد العالي :

الأعراض Symptoms	الأسباب Causes	العلاج Remedy
المناطق محددة بوضوح إلا أنها مشوهة Distorted.	عدم استواء أو انتظام التسخين - القوة الأيونية - PH - المحتوى المائي - عدم انتظام وتجانس تركيب الورق - عدم انتظام التجفيف .	يجب أن يكون الشريط سهل الاتصال بالسطح المبرد - انتظام الرطوبة - إزالة الملح... يظهر الاتزان بعد تطبيق هذه الخطوات .
تكوين المناطق في شكل أهلة Crescents.	التبريد على حواف الشريط أقوى منه عند المركز .	اثنى الشريط على الجوانب.
تبدو المناطق مبرقشة Mottled وملطخة أو مطموسة Blurred.	عدم كفاية التبريد - زيادة بلل السطح المبرد .	قلل توليد الحرارة - اجعل السطح المبرد جافاً - اجعل المنحدر الحراري في الزاوية الصحيحة .
النسب الشاذة للهجرة.	تأثير الفتيل - انقطاع التيار - الاسموزية الكهربية خاصة بارتفاع PH - تخثر المنظم .	اختبر السد السلوفاني وقوة التيار - أضف مادة عديمة الحركة لكشف نقطة البدء .
جفاف الورق واحتراقه بدون دخان أو يصير الورق شفافاً مع مبادلات الحرارة السائلة .	عدم تغطية الورق تماماً خاصة عند قرب وعاء المنظم - اختلاف المنظمات في الشريط وأواني المنظم - تغيرات PH - عدم تشبع المبرد بالمنظم .	اعمل على تلاشي الأسباب المذكورة .

تأخير الفصل	التركيز الزائد من المادة المختبرة	ارفع القوة الأيونية للمنظم
عكس توجيه الهجرة .	ادمصاص عدم تمام ذوبان المادة خدش الورقة .	اخفض قيمة PH أضف مذيباً عضوياً للمنظم جرب الورق زجاجي الألياف . جرب شرائط أسيتيل سليلوز أو رقائق السليلوز رقيق الطبقات. تلاشى الأسباب .
إهتزاز المناطق.	سببه نوع المذيب المذاب فيه المادة .	غير المذيب (مثلاً باستخدام كحول) .

ويستخدم التفريد الكهربي عالي الجهد في فصل خليط من أحماض أمينية أو الببتيدات أو نواتج الهدم الإنزيمي للبروتينات ، كذلك في الكشف عن الأحماض الأمينية للهيموجلوبين ودراسة الصبغات الخلوية المختلفة والليسوزومات ومختلف الأجسام النووية ، كما تنفصل بواسطة هذا التكنيك : الكربوهيدرات والكحولات والإستيرويدات ومخاليط الأيونات المعدنية كما أمكن الفصل الجيد للفينولات .

وتقاس مواقع بقع شرائط التفريد الكهربي بالتعرف على قيم معدل الهجرة Rate of Migration (Rm) ، وهي النسبة بين بعد أو مسافة كل أيون إلى مسافة أو بعد الأيون الأسبق على الشريط فيأخذ القيمة ١ (واحد صحيح) ، فتكون قيم Rm لباقي البقع أقل من الواحد الصحيح ؛ لأنها تنسب للمركب الأول .

٢ ـ التفريد الكهربي بانخفاض الجهد الكهربي :

Low - Voltage Electrophoresis

وفي هذا التكنيك يعلق ورق الترشيح أو شرائط خلات السليلوز بحرية ما بين أواني الإلكترود ، في فراغ رطب ، بتثبيت الشريط في إطار ، أو يعلق في وسطه بجعل طرفيه يتدليان فيكون في شكل حرف V مقلوبا ، يسحب شريط الورق المعلم عليه خط البداية خلال الإلكتروليت ، ثم يعلق لينقط في الجهاز ، وبعد ١٠ دقائق يزال الزائد من الإلكتروليت بقطعة من الورق ، ثم توضع العينة بفرشة رسم Paint Brush أو ماصة ، وتتولد الحرارة في الشريط نتيجة التبخير ، وأثناء التجربة يستمر تبخير الماء ويستمر امتصاص المحلول

المنظم من إناء الإلكترود ، وحيث إن التدفق يكون جهة الطرفين أكبر بينما ينخفض إلى الصفر جهة المركز ؛ لذا يوضع مخلوط العينة في المركز للشريط لتهاجر مكوناته لكلا الاتجاهين .

بعد انتهاء التجربة يجفف الشريط بحرص لتجنب تلف البقع نتيجة عدم انتظام تبخير الماء . يتم تلوين الشريط بصبغة في محلول كحول وحمض خليك وللتقدير الكمي على أجهزة قياس الكثافة الضوئية Densitometer تحول الشرائط لحالة شفافة باستخدام المواد التي تجعل ورق الترشيح شفافًا Transparentizers كزيت البارافين أو أحادي بروموانافثالين وغيرها.

خلاف الورق وخلات السليلوز فقد استخدمت مواد حاملة Carriers أخرى كالجيل Gels ومنها سميت طريقة التفريد الكهربي على الجيل Electrophoresis in Gels ، وقد استخدم فيها نشا البطاطس .

وقد يستبدل چيل Polyacrylamide بدلا من النشا ، أو قد يستخدم الآجار Low - per-cent Agar في صورة Agarose Gels . وقد استخدم التحليل بالتفريد الكهربي على الچيل كثيرا في كيمياء البروتينات وقد يكون الچيل في أعمدة Gel Columns أو رقائق Gel Slab ، والعمود يسمى بالإلكتروفوريسيس الإسطواني Disc Electrophoresis وتميز المناطق عليه بعد التطوير بمنظار خاص للتقدير الكمي أو بالتصوير الفوتوجرافي . ويستخدم في الأعمدة هذه تيار حوالي ٥٠٠ ڤولت وشدة التيار ٠,٥ أمبير . وقد تكون أجهزة التفريد الكهربي إما أفقية أو رأسية أو في شكل حرف V مقلوبا .

ويستخدم جهاز الإيزوتاكوفوريسيس Isotachophoresis (أحد أنواع أجهزة التفريد الكهربي Electrophoresis) في فصل الأيونات المختلفة في حقل تيار مستمر طبقًا لاختلاف حركتها فيتعرف عليها نوعيًا وتقدر مفرداتها بعد ذلك كميًا ، وبهذه الطريقة يمكن فصل وتقدير كل الإضافات الغذائية تقريبًا ، بل يستخدم كذلك في فصل وتقدير مكونات اللحوم الهامة كالنيكلوتيدات ومساعدات الإنزيمات واللاكتات وثاني الفوسفات والسيترات وما شابهها من مركبات في منتجات اللحوم .

٣ - التفريد الكهربي مع وسيلة مناعة Immunoelectrophoresis :

إحدى طرق التحليل المركبة ، إذ يستخدم فيها الإلكتروفوريسيس مع طريق ثانية ، وهي هنا طريقة مناعية Immunological One . فيفصل خليط البروتين بالتفريد الكهربي على الآجار أو الأجاروز أو چيل النشا أو شرائط السليلوز (خلات سليلوز) ، ثم يوضع سيرم مضاد (محتويا على أجسام مضادة Antibodies معينة ضد المركبات المفصولة إليكتروفوريسيا من خليط البروتين) في قنوات أو أخاديد Grooves تجري بطول ممر الهجرة للبروتينات ،

فينتشر هذا السيرم المضاد للمركبات المفصولة ، وفي المناطق التي تتلاقى فيها الأنتيجينات Antigens مع الأجسام المضادة فترسب كل منهما الأخرى مكونة خطوطا معرجة من الترسيبات ، يشير كل خط إلى نوع بروتين فيمكن تمييزه بطرق دراسة الدم والمصل -Sero logically ، أو بالطرق الكيموطبيعية Physicochemically .

ثالثاً : الكروماتوجرافي رقيق الطبقات .

Thin Layer Chromatography (TLC)

نشرت أساسيات أولية في هذا التكنيك على يد عالمين روسيين (Ismailov & Schraiber) عام ١٩٣٨ باستخدام رقائق بسمك ٢م من أكسيد الألومنيوم ، وظل هذا التكنيك في عالم النسيان لصعوبة خفض سمك رقائقه حتى طورها Stahl عامي ٥٦ ، ١٩٥٨ فأصبح تكنيكا قياسياً منذ هذا الحين ، واستخدمت فيه المعادلات لمعايرة قياسات الانبعاث (Kufner & Schle, 1979) واستخدمت المادة الحاملة أو الثابتة على ألواح زجاج أو بلاستك أو ألومنيوم ويجرى التحليل كما في الكروماتوجرافي الورقي ، فهناك من الأجهزة التجارية للتطوير الصاعد Ascending أو الهابط Descending أو الأفقي Horizontal أو العديد -Multi ple وغيرها ، وقد فضل Stahl أن يكون السمك القياسي ٠,٢٥م للرقائق ، وهناك أجهزة تجارية لتفريد الوسط الحامل على الزجاج بسمك من صفر إلى ٢م ، ويقوم هذا التكنيك TCL بفصل مواد يصل كمها من ١٠ نانوجرام إلى ١٠ ملليجرام (بينما الرقائق المجهزة صناعياً Preparative تفصل كميات من ٠,١ إلى ١٠٠ نانوجرام حسب حجم الرقائق) .

ويتوقف اختيار الوسط الحامل Sorbent على حسب صفات المواد المفصولة إن كانت ذائبة في الماء Hydrophilic أو غير ذائبة في الماء Hydrophobic ، ثم صفاتها إن كانت حامضية Acidic أو قاعدية Basic أو متعادلة Neutral ، ثم احتمال تفاعلها مع المذيبات أو المادة الحاملة ، وعليه فتوجد المواد الحاملة التالية :

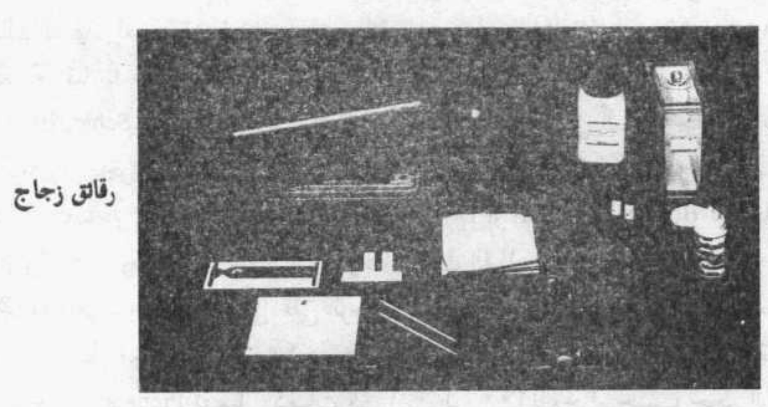
- للمواد المحبة للدهون Lipophilic : أكسيد ألومنيوم ، سليكاچيل ، سليلوز مأستل (خلات) ، بولي أميد .
- وللمواد المحبة للماء Hydrophilic : سليلوز ، سليلوز تبادل أيوني ، سيليت ، بولي أميد .

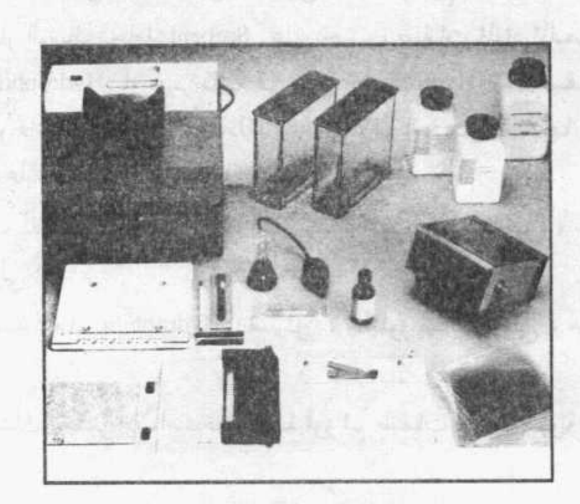
وفي حالة الشك يختبر أولاً استخدام السليلوز ثم طبقات غير عضوية ومقارنة نتائج الفصل .

وسبب الانتشار السريع لهذا التكنيك هو التقدم في تطويره عن باقي أساليب الكروماتوجرافى ، وقد تم التطوير أساساً في :

- اختصار زمن التطوير (٢-٦٠ دقيقة) .

- اختصار مسافة الفصل .
- فصل ممتاز .
- حساسية مرتفعة جداً (١٠-١٠٠ مرة أكبر من الكروماتوجرافي الورقي) .
- ضآلة حجم العينة اللازم للتحليل .
- سهولة التعرف على المركبات المفصولة .
- استخدام رقائق ألومنيوم بدلا من الزجاج .
- ضآلة حجم أواني وأنظمة التطوير .





(شكل ١٥) أدوات الفحص الكروماتوجرافي رقيق الطبقات

وقد يشار بجانب أسماء المواد الحاملة برموز تشير لمعاملة هذه المادة الحاملة ، فمثلا (G) تشير إلى وجود الجبس Gypsum (Ca S04) كمادة رابطة في هذا الـ Sorbent ، (N) عادي Normal بدون مادة رابطة ، (F_{254}) أي مضاف دليل فلورسنتي للقياس على ٢٥٤ نانومتر ، (UV_{254}) مضاف إليه دليل فلورسنتي يعطي فلورسنس أسفل UV بطول موجة UV 254nm) (366 + 254) مضاف إليه دليل فلورسنتي يعطي فلورسنس أسفل UV بطول موجة ٢٥٤ ، ٣٦٦ نانومتر ، (HR) عالي النقاوة Highly Pure ، (A) حامض Acid ، (B) قاعدي Basic ، وتوجد هذه الرقائق TLC - Plates بمقاسات ٢٠×٤٠ ، ٢٠×٢٠ ، ٢٠×١٠ ، ٢٠×٥سم (وهناك حتى ٢٠×١٠٠سم Pre - Coated Plastic Sheets) وحتى ٨×٤سم.

وأفضل تطوير يتم بضبط قيم R_F ما بين ٠,٢–٠,٨ وفي حالة تفريد مادة الادمصاص Adsorbents معمليًا على رقائق الزجاج باستخدام الجهاز الخاص لذلك وهو TLC-Spreader ، يخلط قدر معين من هذه المادة الحاملة مع قدر معلوم (محدد من قبل الشركة المنتجة) من مذيب ، ويتم التجانس فترة محددة (موصى بها من قبل الشركة المنتجة) مع إضافة دليل فلورسنس (أو عدم إضافته) مع مادة رابطة ، وتغذى للجهاز بعد تحديد السمك المطلوب ، ثم تجفف الرقائق وتحفظ حتى استعمالها . وعادة تكون حجم حبيبات هذه المواد الحاملة مشابه لمثيلتها في الكروماتوجرافي العمودي ، كما أن المذيبات المستخدمة في تطوير TLC أو الأعمدة هي ذاتها .

ويستخدم للتطوير أواني تناسب مساحة الرقائق ، ويتم قياس تركيز المواد المفصولة فوتومتريا ، أو إشعاعيًا (للمواد المشعة) أو تستقطع ، ويقدر تركيزها بواسطة Flame Ioni-zation Detection أو اسبكتروفوتومتريا أو بالمقارنة مع تركيزات معلومة من محلول قياسي أسفل لمبات فوق بنفسجية (UV) .

وترجع مصادر الخطأ في TLC لحساسية هذا التكنيك عن الأعمدة لاتساع مسطح الرقائق ، فتكون عرضة لتأثيرات الجو وأبخرة المذيبات والأكسجين وغازات المعمل وخلافها، كما أن الظروف الأخرى التي قد تؤثر على الأعمدة كدرجة الحرارة يمكن إهمالها لصغر حجم العينة وكبر مسطح الرقائق ، فتتلاشى أثر اختلافات الحرارة . إلا أن الضغط الميكانيكي أحد المخاطر الكبرى على الرقائق فتؤدي لفقد الطبقة المدمصة فيفضل إضافة مادة رابطة كالجبس أو النشا أو المركبات العضوية المبلمرة Polymers ، وإن كانت تجعل المادة الحاملة غير صالحة للاستعمال لفترات طويلة ، كما قد تتفاعل مع المواد الأخرى ، ويجب تجفيف الرقائق الملصوقة معمليا بعيداً عن الهواء أو سحب الهواء ، وإلا تشققت الطبقات المدمصة . كما يجب حفظ تانك التطوير Developing Tank على حرارة ثابتة بعيداً عن المدفئة وضوء الشمس أو أشعتها .

تذييل Tailing البقع قد يرجع لواحد أو أكثر من المتغيرات الثلاثة الأساسية (المادة المدمصة ، المذيب ، المادة المختبرة) ، وهو دليل لعدم ملاءمة النظام المتبع ؛ لذا يغير هذا النظام باختيار نوع آخر من الطبقات المدمصة (سواء قاعدي ، حامضي ، متعادل ، نشط ، غير نشط) أو مذيب آخر . وإذا لم تتحرك المادة المختبرة عن خط البداية ؛ فيجب استخدام رقائق أقل نشاطاً أو مذيباً أكثر قطبية ، وإذا تحركت البقع بسرعة جداً ؛ فيستعمل رقائق أنشط أو ومذيب أقل قطبية لخفض قيمة RF . إن لم يتم الفصل جيداً فيجرى تطوير في اتجاه ثان أو يزاد مسافة الهجرة بإطالة فترة التطوير . إذا لم يتخذ المذيب على الرقيقة خطاً منتظماً فيتم تشبيع حيز التانك ببخار المذيب بوضع ورق ترشيح أو كارتون حول جدران الإناء ، فيتشرب بالمذيب ويشبع حيز الإناء ببخاره . ولمنع تداخل العينات يحزز طبقة الادمصاص بقلم معدنى أو سكين بطول الرقيقة ما بين العينات لتمام فصل مسار هجرة العينات عن بعضها بفصل طبقة الادمصاص في شكل شرائط .

واستخدم تكنيك TLC في الكثير من المجالات الصيدلانية والكيمياء الحيوية والصناعات العديدة لفصل العقاقير والأمينات العطرية والنيتروفينولات ومشتقات البيرين ، والڤيتامينات الذائبة في الماء ، الباربيتيورات ، مورفين ، كوينين ، فضلات المضادات الحشرية ، المواد الملونة النباتية ، السموم الفطرية ، الأحماض الأمينية ، المضادات الحيوية ، الإستيرويدات وغيرها كثير جداً من كربوهيدرات ودهون .... إلخ .

ويتشابه TLC مع الكروماتوجرافي الورقي في تكنيك التطوير وكثير من التطبيقات وتكنيك التقدير الكمي ، ولكن يختلفا معاً في الوسط الثابت ، فالأول يستخدم المواد المدمصة Sorbents بفردها عشوائياً على رقائق زجاج أو خلافه ، بينما في الثاني فإن تركيب ورق الكروماتوجرافي الليفي يميزه عن TLC . وعموماً ولمزايا TLC العديدة سابقة الذكر فإنه ينافس الكروماتوجرافي الورقي ويفوقه بمراحل ، وذلك للتطور الشديد في صناعة أواني التطوير ، وفرد المواد الحاملة ومحاليل الإظهار ، والتصوير بل وآلية وضع العينات التطوير والتقييم والميكروتكنيك المؤدى لما يعرف الآن بالكروماتوجرافى رقيق الطبقة عالي الأداء High Performance Thin Layer Chromatography (HP TLC) أو النانو Nano-TLC ، وللتقدير الكمي داخل العلاقة الخطية (بين التركيز والامتصاص) لهذا التكنيك يلزم استخدام تركيزات صغيرة جداً ؛ لأن بزيادة التركيز عن مدى HP TLC تقل نسبة الامتصاص ولا يمكن القياس الكمي . أما القياس الطبيعي ففي المدى المرئي من أطوال الموجات (٤٠٠–٧٠٠ نانومتر) ، أو في مدى الأشعة فوق البنفسجية (٢٠٠–٤٠٠ نانومتر) بقياس المركبات الفلورسنتية بالحث بلمبة هالوچينية . وفي هذا التكنيك الحديث HPTLC يتم التطوير مسافة بسيطة (٢–٥سم) في زمن وجيز جداً (١–٩ دقائق) ، ورغم صغر مساحة الرقائق (١٠×١٠سم) فإنها تسع إلى ٣٢ عينة ، وحدود الكشف الكمي عليها

عشرة أضعاف دقة TLC المعتاد ، مع دقة الفصل المتناهي ، وصغر حجم العينة الشديد (٥٠-٢٣٠ نانولتر) . كما استخدمت في TLC مواد حاملة رجعية (C8, C18) Reversed Phase تحتوي الكيل هيدروسيليكون سليكاجيل مهيئة لفصل المواد شديدة القطبية .

رابعًا : أعمدة الكروماتوجرافي Column Chromatography :

وهي وسيلة فصل كروماتوجرافي تعتمد على :

- مادة الادمصاص .
- المذيب المستخدم .
- طول ومساحة مقطع العمود .
- نوع وتركيز العينة .
- درجة الحرارة (زيادتها تقلل الادمصاص) .

فلو كانت كمية مادة الادمصاص واحدة مع اختلاف أطوال الأعمدة ، فيكون العمود الأطول فصله أحسن ، ولو تساوت الأعمدة في الطول فتتناسب قوة الفصل لمكونات العينة مع مساحة مقطع العمود ، أي يزيد الفصل بزيادة مساحة مقطع العمود .

وتقسم أوساط الادمصاص الصلبة إلي مجاميع قطبية (أكاسيد المعادن كالالومينا والسليكاجيل كمواد بولارية ذات روابط هيدروچينية مدمصة لذرات الأوكسچين ومجاميع الهيدروكسيل) وغير قطبية (كالفحم) ، وعليه فالمواد البولارية تمسك على المواد المدمصة بعكس المواد غير البولارية .

وكل مادة من مكونات الخليط تتفاعل بمفردها مع مادة الادمصاص والمذيب بما يسمى معامل التوزيع بين الوسطين (الثابت والمتحرك أي المدمص والمذيب) فلكل مكون من الخليط معامل توزيع خاص .

بانخفاض درجة الحرارة تقل الحركة الجزيئية للمركبات فتزيد القدرة على الادمصاص. وتستخدم طرق الفصل المختلفة (ادمصاص - تجزئ - تبادل أيونات) في الأعمدة الكروماتوجرافية ، وهي تتطلب نفس متطلبات الكروماتوجرافي الورقي ورقيق الطبقة (انتخاب المادة الحاملة - انتخاب المذيب - وضع العينة - إظهار الكروماتوجرام - التعرف على المناطق واستخلاصها) ، فيستخدم كمادة حاملة كثيرًا جدًا أكسيد الألومنيوم ، كما قد يستخدم الفحم وكربونات الكالسيوم وأكسيد الماغنسيوم والسليكاچيل ، السيليت وغيرها كثيرًا ، فتملأ بها أعمدة من الزجاج أو البلاستك بأقطار وأطوال مختلفة ، وقد توضع جافة أو معلقة في مذيب إذا كانت الأعمدة ضيقة .

ولانتظام البقع يحتفظ بسطح المادة الحاملة مستويًا بتغطيته بورقة ترشيح أو قطن ، وكذلك يكون في قاع العمود ورق ترشيح أو قطن أو صوف زجاجي لمنع سقوط المادة الحاملة ، وبعد التحميض يمكن إظهاره لتمييز المناطق إذا كانت ملونة ، أو قد يفحص تحت الأشعة فوق البنفسجية ، أو باستعمال أدلة ملونة أو باستخلاص المناطق المنفصلة

وتقديرها بتفاعلات مناسبة .

تستخدم أعمدة الكروماتوجرافي في تقدير صبغات النباتات والأحماض الأمينية والسكريات والقلويدات والستيرولات والأحماض الدهنية ، وكثير من المركبات .

وكما يستخدم العمود للتحليل النوعي والكمي (كما في TLC) فإنه يستخدم كذلك (كما في TLC) في التنقية قبل التقدير الكمي .

فالكروماتوجرافي السائل Liquid Chromatography تستعمل فيه أعمدة الكروماتوجرافي المختلفة الأطوال والأقطار والمواد الحاملة ، ومنها ما هو معبأ جاهز (بلاستك أو صلب) أو يعبأ يدوياً .

وينقسم الكروماتوجرافي السائل لما يأتي :

١ ـ سائل صلب Liquid-Solid (LSC) ، وهو كروماتوجرافي ادمصاصي ، ذو سطوح نشطة غالبًا من سيليكاجيل ، أكسيد ألومنيوم ، سليكات ماغنسيوم ، ويستخدم معها مذيبات للتطوير وهي محاليل غير قطبية أو متوسطة القطبية .

٢ ـ سائل سائل Liquid-Liquid (LLC) ، وفيه تستخدم مواد مختلفة الذائبية ، وعليه تستخدم اختلاف توزيعها بين الوسطين السائلين للفصل ، وتتوقف قطبية مادة التطوير على العينة ، والوسط الثابت هنا مائي والمتحرك أقل قطبية .

٣ ـ رجعي Reversed Phase (RP) كنظام ادمصاص ، يكون الطور الساكن محبا للدهن، بينما الطور المتحرك محبا للماء ، وفيه تستخدم وسائل سير مائية ، والطور الساكن سليكا جيل مغطاة بالكيل هيدروسيليكون (C_8 ، C_{18}) .

٤ ـ تبادل أيوني .

٥ ـ تخلل الجيل Gel Permeation (GPC) .

وفي الواقع العملي يحدد حجم الكروماتوجرام (المتوقف على الطور المتحرك) Mobile Phase بوقت الامتصاص (ظهور المنحنى) ، سرعة التدفق للطور المتحرك ، معامل التجزىء ومعاملات الكفاءة ، ويتوقف ارتفاع درجة الفصل النظري على سرعة الطور المتحرك ، متوسط حجم حبيبات (قطرها) الوسط الثابت في العمود .

وعند فصل مكونات مركب يهمنا معرفة وقت الفصل اللازم لبلوغ حل أو فصل المركب المعين ، ويجب أن يكون زمن الفصل كبيراً بقدر الإمكان .

ومن العوامل المؤثرة على نتائج التحليل الكروماتوجرافي السائل ما يلي :

١ ـ قصر طول العمود يزيد سرعة خروج المركب المنفصل .

٢ ـ بزيادة سرعة مرور المذيب Flow Rate يرتفع طول المنحنيات وتتداخل معاً .

٣ ـ بزيادة قطبية المذيب يتأخر ظهور منحنى المركب المنفصل .

٤ ـ الحرارة العالية تزيد سرعة الفصل وخروج المركبات لكن زيادتها عن ٧٠–٨٠ْم تحدث تضليلاً في الـ Detector .

٥ ـ صغر حجم حبيبات المادة المالئة للعمود تزيد سرعة خروج المركبات .

وفي هذا التكنيك تم تطور كبير ، واستخدام التكنولوجيا أدى لاستحداث الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (أو عالي الضغط) High Pressure (performance) Liquid Chromatography (HPLC) ، وهو سريع الأداء ، دقيق النتائج ، يلزمه حجم ضئيل جداً من العينة ، ويسير المذيب في العمود تحت ضغط .

ويتم التعرف على منحنى المركبات المطلوبة بالمقارنة بمحلول قياسي خارجي External Standard أو داخلي Internal Standard ، أو باستخدام النظائر المشعة والاستدلال على الإشعاع ، أو بتمييز المركب بإمراره على Detector لتقديره ضوئياً أو إسبكتروفوتومتريا أو فلورمتريا ، أو الحصول على جزء Fraction من المركب من HPLC وتقدير تركيزه كيمائياً أو بتكنيك آخر كروماتوجرافيا أو إنزيميا أو بعمل مشتقات Derivation .

وقد يتصل هذا الجهاز بأكثر من عمود وأكثر من Detector ، فيمكن أن يتصل عمود بطلمبة بكاشف فوق بنفسجي UV-Detector ، وكذلك بعمود ثانٍ بطلمبة ثانية بكاشف فلورمتري .

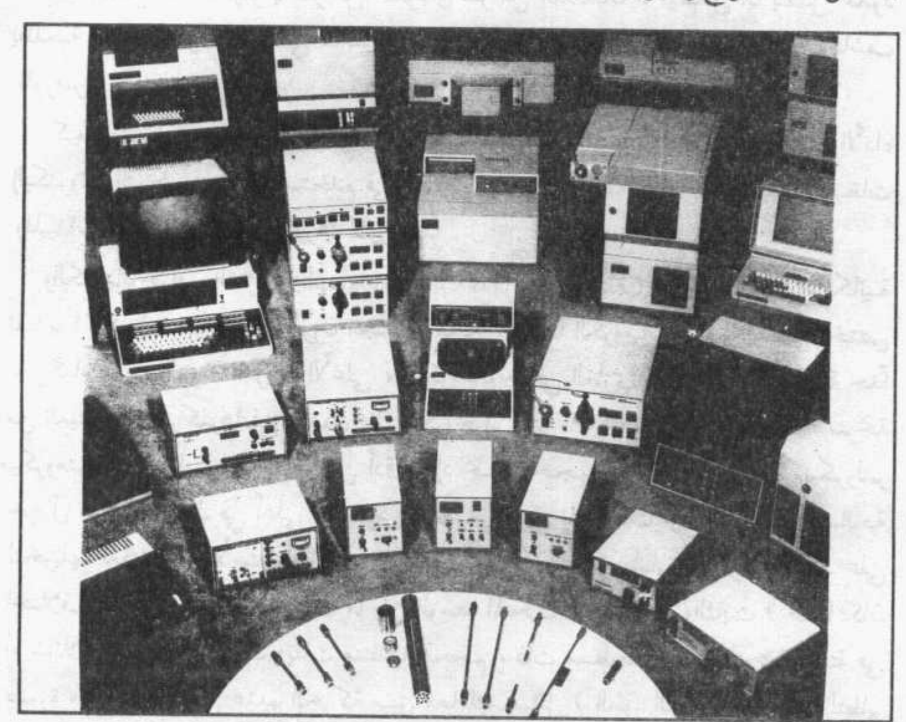
كما يتصل به رسام للمنحنيات بحاسب لمساحات المنحنيات ، وكلها ذاتية الأداء إليكترونية التركيب ، وقد استخدم في فصل الڤيتامينات والأحماض الأمينية والصبغات والمبيدات والسموم الفطرية وغيرها كثيرا جداً .

والكروماتوجرافي الغازي Gas Chromatography وهو يختلف عن السائل في إمكانية تقدير المركبات منخفضة الوزن الجزيئي عليه ، بينما الكروماتوجراف السائل يختص بالمركبات ذات الوزن الجزيئي الأعلى ، والكروماتوجرافي الغازي يقدر حجوماً بسيطة جداً من العينة والتي تركيزها في حدود ١٠ ميكروجرام حتى ٥٠٠مجم ؛ ولذلك يلزمه سرنجة ميكرومترية (كما في HPLC لكن أدق) إذ تحقن الحجوماً في حدود ١–٣ ميكرولتر خلال سدادة مطاط في أعلى العمود ، ويجب تحويل المركبات أولاً إلى صور صالحة لتحويلها لغازات (بالأستلة أو الأسترة وغيرها لعمل مشتقات طيارة) ، وهو يعتمد على اختلاف معاملات توزيع المركبات ما بين الوسط المتحرك (الغازي) والثابت (صلباً كان أو سائلا) . ويملأ العمود بجزيئات منتظمة الحجم ، ذات مسطحات عالية النوعية وثابتة في صورة مسحوق ساكن عديم الحركة سبق معاملته بسائل (الطور الساكن) عديم التطاير تحت ظروف التحليل متصاعدة الحرارة . وكما تتوقف جودة الفصل على نوع العمود

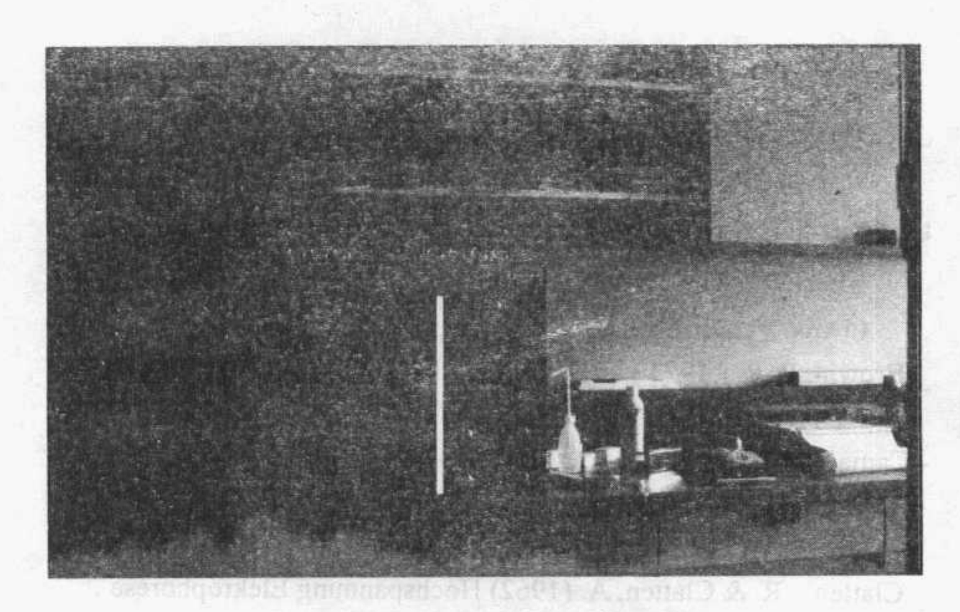
وطوله فتتوقف كذلك على حجم العينة وضغط الغاز . ويتم التقدير الكمى بمرور العينة المتطايرة على كاشف Detector .

والطور المتحرك هو الغاز الخامل سواء نيتروچين أو ثانى أكسيد كربون أو هيدروچين أو هليوم أو أرجون على حرارة غالبا ٢٠٠ °م . وبحقن العينة ومرورها مع الغاز يحدث اتزان ما بينها وبين الطور الساكن والمتحرك ، وتمر على الكاشف فالمسجل . ويتوقف نوع الغاز الخامل على حسب نوع الكاشف . والأعمدة يتراوح طولهاما بين ١,٥ - ٤,٥ م وقطرها ٢ - ١٠ م وهى صلب أو زجاج أو نيكل مع نحاس . وتملأ بالمادة المدمصة أو المجزئة كالألومنيا أو الكربون المنشط والسليكاچيل ، وتحمل سائلاً غير متطاير كزيت السليكون أو البولى إثيلين جليكول . أما الكاشف فقد يكون مقدراً للحرارة أو للتأين أو للكتلة أو كهروضوئيا للهب أو اسبكتروفوتومتريا للامتصاص أو للتأين للمواد المشعة .

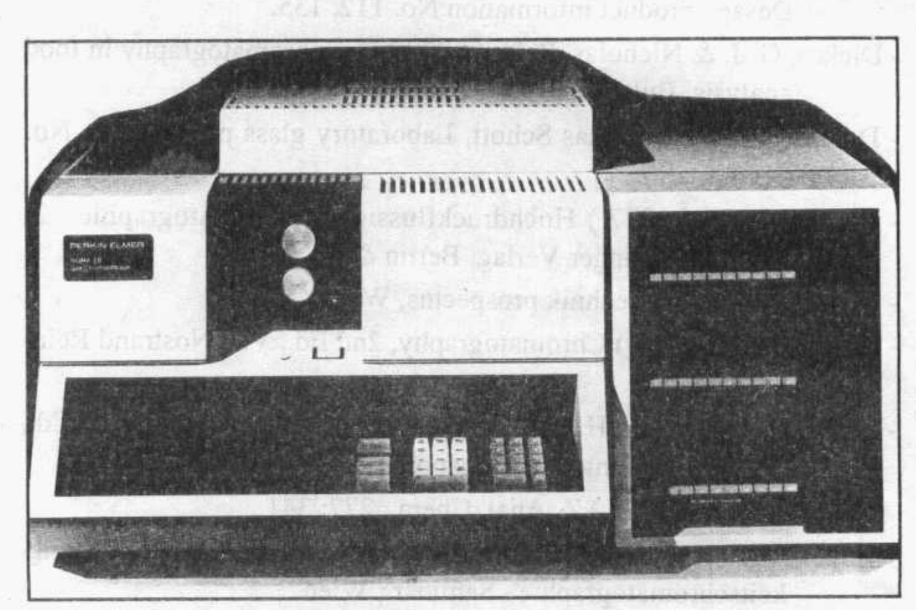
وتتم المقارنة باستخدام محلول قياسى داخلى أو خارجى لحساب تركيز المركبات المدروسة من عقاقير ومضادات حيوية ومبيدات وأحماض دهنية وسموم مختلفة وأحماض بولية وكحولات وأحماض عضوية وغيرها كثير جداً . وهو الآن متطور جدا ويعمل باللمس؛ لأنه مبرمج إلكترونياً .



(شكل ١٦) نماذج لأجهزة الكروماتوجرافي السائل



(شكل ١٧) كروماتوجرافي غازي



(شكل ١٨) كروماتوجرافي غازي

ويمكن الرجوع إلى المراجع التالية لزيادة الإيضاح :

- مصطفى صفوت محمد (وآخرون) : كيمياء وتحليل الأغذية - دار المعارف بالأسكندرية (١٩٦٣) .

- مصطفى مرسى (وآخرون) : أساسيات البحوث الزراعية - مكتبة الأنجلو المصرية (١٩٦٨) .

- محمد ممتاز الجندى : التحليل الكروماتوجرافى - دار المعارف بمصر (١٩٨٧) .

- Brown , P. R. (1973) High Pressure Liquid Chromatography . Academic Press , N. y .
- Camag product information No . 251 - 401 , Tl 80 .
- Cassldy , H. G. (1957) Fundamental of Chromatography . Interscience Publ., N. Y .
- Clatten , R. & Clatten, A. (1962) Hochspannung Elekrophorese . G. Thiee, Stuttgart.
- Desaga Catalogue (1978) Thin Layer Chromatography electrophoresis Labratory Technique, Heidelberg .
- 140, 142, 150, 151, 154, 161, 171, 173, 188, 190, 191, 206, &207. Desaga product information No. 112, 135.
- Dickes, G. J. & Nicholas, P. V. (1978) Gas chromatography in food analysis, Butterworthes, London .
- Duran (1980) Jena glas Schott, Laboratory glass prospectus , No. 5164, mainz .
- Englhardt, H. (1977) Hochdruckflussigkeitschromatographie . 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin & N . y .
- Haack, P. (1978) Technik prospectus, Wien.
- Heftmam, E. (1967) Chromatography, 2nd Ed., Van Nostrand Reinhold Co. N.y.
- Holm, D. J. & Peck , H. (1993) Analytical Biochemistry , 2 nd Ed., Longman , Printed in Singapore .
- Huber, J. F. K. (1975) Z. Anal. Chem., 277: 341 .
- Huber , J. F. K. (1977) Einfuhrung in die moderne Saulen - Flussigkeitschromatographie . Seminar , Wien.
- Kiepe Electric (1980) Sekunden - Thermometer (15 - 9) Wien .
- Kufner, G. & Schlegel, H. (1979) J. Chromatogr., 169 : 1410 .

- Less, R. (1975) Food Analysis , 3 rd Ed ., Leanard Hill Books, London .
- Macherey - Nagel + Co. (1974) Paper, Column, Thin Layer, Gas chromatography, Duren, Germany .
- Macherey - Nagel + Co., (1981) PH - Indecator paper, test papers, filter papers, Visocolor test kits and filter aids. Duren , Germany .
- Merck , E. (1974) Klinisches Labor , 12 . Auflage , Merck, Darmst adt .
- Mettler prespectus (1979) Zurich .
- Oser , B. L. (1979) Hawkes physiological chemistry. 14th Ed., Tata Mc Graw _ Hill, New Delhi .
- Pharmacia Fine Chemicals (1981) the pharmacia Immunoelectrophoresis System, Sweden .
- Pierce, W. C. & Haenisch, L. (1955) Quantitative Analysis, 3rd Ed. , Gohan Wiley & Sons, N. Y .
- Ribeiro, L. P. etal. (1961) Paper electrophoresis. Elsevier, Amsterdam .
- Rotronic AG (1980) Feuchte - U. Temperatur - Messung, Zurich .
- Sartorius (1981) Das superbreite Waageprogramm, Gottingen .
- Stahl, E. (1967) Dunnschicht - Chromatographie. 2. Auflage, Springer - Verlag , Berlin .
- Varley , H. (1978) Practical Clinical Biochemistry . 4 th Ed., Arnold - Heinemann , India .
- Wahel International LTD (1990) Wahl heat spy Katalog Nr. W-101 , California .
- Woelm Pharma (1985) TLC - Product Information No. Al 10, 17, Germany .

الفصل الثالث

سحب العينات وحفظها

أولاً : مواد العلف :

ولإجراء التحاليل لابد أن تكون العينات المحللة عينات ممثلة تماماً للمواد المراد تحليلها ، مع عدم تلويثها عند أخذ العينات . وأخذ العينات له طرق متعددة طبقاً لاختلاف نوع وتجانس المادة. وطرق أخذ العينة تنص عليه قوانين الأعلاف الرسمية (القانون رقم ٥٣ لسنة ١٩٦٦ والقـرار الوزاري رقم ٧٥ لسنة ١٩٦٧ والقـرار الوزاري رقم ٥٥٤ لسنة ١٩٨٤).

وفيما يلي طرق الحصول على العينات :

١ ـ الأعلاف الخضراء المزروعة في الحقل : يؤخذ ٢–٣ نباتات من ٣٠–٥٠ موقعاً من الحقل طبقاً لمساحة الأرض ، وتجانس كثافة النباتات (أو يحش مساحة ١م^2 من ١٠–٢٠موقعاً) . لاحظ أن النباتات حية وغنية بالرطوبة ، فاختصر الوقت المأخوذ فيه العينة ، لتقلل الفقد في الرطوبة أو التغييرات الحيوية التي تحدث منذ قطعها إلى بدء تحليلها. حافظ على الأوراق من التساقط واخلط النباتات معاً على أن تكون وزنة حوالي ٥ كيلو جرام ، وضعها في أكياس بلاستك غير منفذ للهواء ، وترسل للمعمل حيث تخرط بآلة حادة حتى لا تعصر ، مع تقطيع السيقان والأوراق معاً بأطوال ٣سم تقريباً ، ثم تخلط جيداً للتجانس ، وتكوم وتؤخذ من هذه الكومة حوالي ٢٠ عينة من مختلف أعماق وارتفاعات الكومة ، وتجمع في كومة واحدة ، ويكرر فيها ما حدث في الكومة الأصلية حتى نصل إلى عينة نهائية وزنها حوالي ١–١,٥ كيلو ، يؤخذ منها وزنتان ٣٠–٥٠جم في كأسين لتقدير الرطوبة الكلية ، وتجفف باقي العينة مباشرة ، وتطحن ناعماً في مناخل سعة ثقوبها ١م وتحفظ في برطمان محكم لحين التحليل .

٢ ـ الدريس والتبن في أكــوام : يؤخذ منها ٢٠ عينة بالشوكة من أعماق وارتفاعات مختلفة لعمل كومة ، تختصر بنفس الطريق حتى نحصل على عينة نهائية ممثلة للكومة الكبيرة وزنها حوالي ١ كيلو ، توضع في أكياس بلاستك ، وترسل للمعمل للطحن الناعم والحفظ في برطمان محكم لحين التحليل .

٣ ـ الدريس والتبن في بالات : في حالة وجود سكين الدريس يؤخذ عينة من أعلى لأسفل بالسكين ، وتجزأ ويوضع منها ١ كيلو جرام في كيس بلاستك ، مع الحفاظ على الأوراق التي قد تتساقط . وإلا في حالة عدم وجود سلاح الدريس فيؤخذ عينات من كل

البالات إن قلت عن ١٠بالات ، أو من ١٠ بالات إن كان عددها ١٠-٢٠ ، أو من ١٥ بالة إن كان عددها ٢٠-٤٠ بالة ، أو من ٢٠ بالة إن زاد عددها عن ٤٠ بالة ، وكلما زاد عدد العينات كلما كان ذلك أدعى لدقة التحليل ، وتؤخذ العينات من أطراف ووسط وقلب البالات ، وتكوم وتختصر الكومة بالطريقة السابقة حتى نحصل على عينة نهائية ممثلة جيداً ، وترسل في كيس بلاستك للمعمل لطحنها جيداً ، وتعبئتها في برطمان محكم لحين التحليل .

٤ ـ أجولة الرجيع والنخالة : تؤخذ عينات بالمجس أو القلم (اسطوانة مدببة الطرف ومشطوفة لسهولة دخولها الجوال فتنساب محتوياته بالقلم) ، وتؤخذ العينات من رأس ووسط ومؤخرة الجوال بنظام مشابه للمتبع في أخذ العينات من البالات ، من حيث النسبة العددية المذكورة سابقاً . وتختصر العينة بنفس النظام وترسل للطحن والحفظ في برطمان لحين التحليل .

٥ ـ عبوات العلف المصنع : يجرى عليها ما ذكر سابقاً على أجولة الرجيع والردة ، وتؤخذ عينات تمثل ١٠٠ طن أو إنتاج المصنع في ٣ أيام متتالية أيها أقل ، ويجب ألا تقل العينة عن ٢ كجم .

٦ ـ ألواح الكسب : تؤخذ عينات من طرفي ووسط الألواح بنفس النسبة العددية المذكورة للبالات والأجولة ، وتجرش وتطحن ناعماً ، وتوضع في برطمان محكم لحين التحليل .

٧ ـ السيلاج : تؤخذ عينات (بعد إهمال الحواف بسمك ٣٠-٥٠سم) بواسطة ثاقب خاص (بريمة) في حدود ١٠ عينات من مواقع متعددة ، تختصر في النهاية إلى حوالي ١ كيلو توضع في أوان أو علب (زجاجية أو صفيح أو بلاستك) ، بحيث تملأ تماماً ، وتكون غير منفذة للهواء محكمة القفل ، وترسل للمعمل للتحليل .

٨ ـ الدرنات والجذور : تختلف حجم العينات كثيراً ، ففي بنجر السكر وبنجر العلف واللفت يكن وزن العينة على الأقل ٢٥ كيلو جرام ، بينما للبطاطس عل الأقل ١٥ كيلو جرام . في العينات المأخوذة من أعلاف غير معبأة ـ أي في أكوام ـ تكون العينات كل منها يزن ٤ كيلو جرام ، أما عددها فيكون سبع عينات للكومة وزن ٢,٥ طن ، أما إذا زاد وزنها عن ٢,٥ طن فيكون عدد العينات المأخوذة منها عبارة عن الجذر التربيعي لوزن الكومة بالطن مضروباً في ٢٠ بحد أقصى ٤٠ عينة [مثال : سيلو مملوء بالشعير بمقدار ٢٥ طناً .احسب عدد العينات الفردية المفروض أخذها لتكوين عينة ممثلة لهذا اللوط .الحل: عدد العينات = $\sqrt{٢٥}$ × ٢٠ = ١٠٠ عينة ، إلا أن الحد الأقصى ٤٠ عينة ، لذا يؤخذ منها ٤٠ عينة فقط] .

أما في حالة الأعلاف المعبأة : ففي حالة العبوات سعة ١ كيلو يؤخذ منها ٤ عينات ،

وإذا كانت العبوات سعة أكبر من ١ كيلو فإذا كان عدد العبوات ٤ تؤخذ كلها ، ٥-١٦ عبوة يؤخذ منها ٤ ، وفوق ١٦ عبوة يؤخذ منها الجذر التربيعي لعددها بحد أقصى ٢٠ عينة، وكما ذكر فإن العينات الفردية الأولية يتوقف عددها على وزن اللوط أو عدد عبواته ، وهي حوالي ٧ عينات تجمع معاً في عينة مجمعة وزنها حوالي ٤ كيلو ، تختصر إلى ٢ كيلو ثم منها تؤخذ العينات النهائية للتحليل حوالي ١/٢ كيلو . في حالة كبر عدد العبوات يؤخذ عينات من الجذر التربيعي لعدد العبوات ، أو نصف الجذر التربيعي في حالة كثرة العبوات جداً .

وتتم التعبئة في عبوات نظيفة جافة محكمة ضد الرطوبة والهواء غير منفذة . وتوضع على العبوات (أو بداخلها) البيانات اللازمة عن مادة العلف ، مثلاً : صفات العلف ، واسم وعنوان حائز العلف ، وتاريخ أخذ العينة ، ورقم محضر أخذ العينة . كما يتم تحرير محضر باسم ونوع مادة العلف ، وتاريخ الحش ، ونوع التربة والتسميد ، ونوع التجفيف الذي أجرى من قبل (للدريس) ، ونوع حفرة السيلاج والتحميض الذي أجرى ، وخلافه من ظروف موقع أخذ العينة ، حقل كان أو مخزن أو مصنع أو شونة .

وتوجه العينات هذه إلى التحليل الغذائي وهو تحليل إجمالي Summative Analysis أو تقريبي Proximate Analysis ؛ لأنه غير متخصص ، إذ يحلل مجاميع من المركبات ، لكنه رغم ذلك سهل الإجراء نسبياً وسريع الأداء نسبياً ، ويمكن إعادة التقديرات والحصول على نفس النتائج . ويجرى اختصار على العينة المرسلة للمعمل بتكنيك يسمى quartering وفيها توضع العينة على فرخ ورق وتقلب بجاروف ثم يرسم عليها صليب وهمي لتقسيمها إلى ٤ أرباع ، يؤخذ منها ربعان متقابلان ويجرى عليهما ما سبق حتى تختصر العينة إلى حوالي ٢٥٠ جم تكون هي العينة النهائية . فبالتجفيف للمادة الطازجة نحصل على المادة الجافة ومنها نقدر الماء الخام . وبحرق المادة الجافة نحصل على الرماد الخام وتتطاير المادة العضوية التي يمكن تقدير مكوناتها من بروتين خام ودهن خام وألياف خام ومستخلص خالي النتروجين . وتتم التقديرات كلها على المادة الجافة المطحونة والمنخولة بمناخل لها Mesh (عدد ثقوب / بوصة مربعة) مناسبة . ويتم التقدير لهذه المكونات على مادة العلف المطحونة ناعماً بحيث تمر كلها بلا بواق من خلال منخل ثقوبه ١ م . وذلك لمادة العلف الجافة هوائياً (رطوبة ١٥ ٪) ، وتجرى التقديرات مزدوجة . وإذا لم تتوفر هذه الشروط في مادة العلف فلابد من تجفيفها وطحنها قبل إجراء التقديرات ، وذلك عادة في الأعلاف الرطبة ، فتؤخذ منها وزنة حوالي ١٠٠ جم عينة مقطعة (بدقة ثاني رقم عشري من الجرام) في زجاجة ساعة ، أو طبق صلب لا يصدأ ، وتجفف حوالي ٢٤ ساعة على حرارة ٥٠-٧٠م حتى الوصول لمادة جافة حوالي ٩٠ ٪ . وبعد أن تبرد يعاد وزنها لثاني رقم عشري (١٠ مجم) ، ويقدر الفقد في الماء حتى يمكن أن تنسب التقديرات التالية للوزن

الطازج لمادة العلف . التقديرات الفردية لمواد العلف ثابتة التركيب تقريباً تعطي فكرة عامة سريعة للحكم التقريبي على قيمتها كتقدير رطوبة البطاطس أو بروتين مركزات البروتين أو دهن المواد الغنية به .

وينص دستور العلف البريطاني على أخذ العينات بالأعداد التالية :

نظام أخذ العينات من العبوات :

عدد الأجولة أو العبوات المحتوية على الأعلاف	عدد الأجولة أو العبوات المنتخبة لأخذ عينات منها
١ – ٤	كل العبوات
٥ –١٦	ليس أقل من ٤
١٧ – ٢٥	ليس أقل من ٥
٢٦ – ٣٦	ليس أقل من ٦
٣٧ – ٤٩	ليس أقل من ٧
٥٠ – ٦٤	ليس أقل من ٨
٦٥ – ٨١	ليس أقل من ٩
٨٢ – ١٠٠	ليس أقل من ١٠
١٠١ – ١٢١	ليس أقل من ١١
١٢٢ – ١٤٤	ليس أقل من ١٢
١٤٥ – ١٦٩	ليس أقل من ١٣
١٧٠ – ١٩٦	ليس أقل من ١٤
١٩٧ – ٢٢٥	ليس أقل من ١٥
٢٢٦ – ٢٥٦	ليس أقل من ١٦
٢٥٧ – ٢٨٩	ليس أقل من ١٧
٢٩٠ – ٣٢٤	ليس أقل من ١٨
٣٢٥ – ٣٦١	ليس أقل من ١٩
٣٦٢ – ٤٠٠	ليس أقل من ٢٠
٤٠١ – ٤٤١	ليس أقل من ٢١
٤٤٢ – ٤٨٤	ليس أقل من ٢٢

عدد الأجولة أو العبوات المحتوية على الأعلاف	عدد الأجولة أو العبوات المنتخبة لأخذ عينات منها
٤٨٥ – ٥٢٩	ليس أقل من ٢٣
٥٣٠ – ٥٧٦	ليس أقل من ٢٤
٥٧٧ – ٦٢٥	ليس أقل من ٢٥
٦٢٦ – ٦٧٦	ليس أقل من ٢٦
٦٧٧ – ٧٢٩	ليس أقل من ٢٧
٧٣٠ – ٧٨٤	ليس أقل من ٢٨
٧٨٥ – ٨٤١	ليس أقل من ٢٩
٨٤٢ – ٩٠٠	ليس أقل من ٣٠
٩٠١ – ٩٦١	ليس أقل من ٣١
٩٦٢ – ١٠٢٤	ليس أقل من ٣٢
١٠٢٥ – ١٠٨٩	ليس أقل من ٣٣
١٠٩٠ – ١١٥٦	ليس أقل من ٣٤
١١٥٧ – ١٢٢٥	ليس أقل من ٣٥
١٢٢٦ – ١٢٩٦	ليس أقل من ٣٦
١٢٩٧ – ١٣٦٩	ليس أقل من ٣٧
١٣٧٠ – ١٤٤٤	ليس أقل من ٣٨
١٤٤٥ – ١٥٢١	ليس أقل من ٣٩
١٥٢٢ وأكثر	ليس أقل من ٤٠

نظام أخذ العينات غير المعبأ

حجم اللوط بالطن	عدد العينات المأخوذة
حتى ٢,٥	ليس أقل من ٧
أكثر من ٢,٥ وحتى ٣	ليس أقل من ٨
أكثر من ٣ وحتى ٤	ليس أقل من ٩
أكثر من ٤ وحتى ٥	ليس أقل من ١٠
أكثر من ٥ وحتى ٦	ليس أقل من ١١
أكثر من ٦ وحتى ٧	ليس أقل من ١٢
أكثر من ٧ وحتى ٨	ليس أقل من ١٣

حجم اللوط بالطن	عدد العينات المأخوذة
أكثر من ٨ وحتى ٩	ليس أقل من ١٤
أكثر من ٩ وحتى ١١	ليس أقل من ١٥
أكثر من ١١ وحتى ١٢	ليس أقل من ١٦
أكثر من ١٢ وحتى ١٤	ليس أقل من ١٧
أكثر من ١٤ وحتى ١٦	ليس أقل من ١٨
أكثر من ١٦ وحتى ١٨	ليس أقل من ١٩
أكثر من ١٨ وحتى ٢٠	ليس أقل من ٢٠
أكثر من ٢٠ وحتى ٢٢	ليس أقل من ٢١
أكثر من ٢٢ وحتى ٢٤	ليس أقل من ٢٢
أكثر من ٢٤ وحتى ٢٦	ليس أقل من ٢٣
أكثر من ٢٦ وحتى ٢٨	ليس أقل من ٢٤
أكثر من ٢٨ وحتى ٣١	ليس أقل من ٢٥
أكثر من ٣١ وحتى ٣٣	ليس أقل من ٢٦
أكثر من ٣٣ وحتى ٣٦	ليس أقل من ٢٧
أكثر من ٣٦ وحتى ٣٩	ليس أقل من ٢٨
أكثر من ٣٩ وحتى ٤٢	ليس أقل من ٢٩
أكثر من ٤٢ وحتى ٤٥	ليس أقل من ٣٠
أكثر من ٤٥ وحتى ٤٨	ليس أقل من ٣١
أكثر من ٤٨ وحتى ٥١	ليس أقل من ٣٢
أكثر من ٥١ وحتى ٥٤	ليس أقل من ٣٣
أكثر من ٥٤ وحتى ٥٧	ليس أقل من ٣٤
أكثر من ٥٧ وحتى ٦١	ليس أقل من ٣٥
أكثر من ٦١ وحتى ٦٤	ليس أقل من ٣٦
أكثر من ٦٤ وحتى ٦٨	ليس أقل من ٣٧
أكثر من ٦٨ وحتى ٧٢	ليس أقل من ٣٨
أكثر من ٧٢ وحتى ٧٦	ليس أقل من ٣٩
أكثر من ٧٦	ليس أقل من ٤٠

ثانيًا : الماء والكائنات المائية والتربة :

أ ـ الماء :

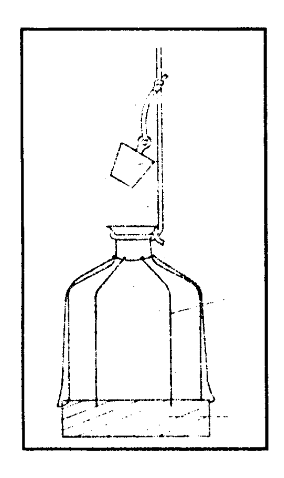
تجرى تحاليل الماء طبقًا للهدف من التحليل ، فإن كان فحصًا دوريًا لصفات الماء فمن المهم أخذ العينة قبل الفجر لتقدير أقل أوكسجين ذائب ، وبعد التغذية لأقصى محتوى من الأمونيا وطلب الأوكسجين البيولوجي Biological Oxygen Demand ، وبعد المطر للجوامد العالقة ؛ وإن كان فحصًا لملاءمة الماء لنوع معين من السمك أو لمرحلة معينة كالنضج الجنسي أو للفقس أو لرعاية اليرقات ، فمستنقعات الصرف يجب فحصها موسميًا للأوكسجين الذائب Dissolved Oxygen ، وماء المفرخات يفحص للعناصر الثقيلة كالنحاس والزنك ؛ ولتقرير الإنتاجية الطبيعية لبحيرة أو حوض كأساس لتخزين السمك وتقدير محصوله ، فمن المهم دراسة العوامل الطبيعية ، كالتطورات في خط الشاطئ ، وتصور عن الأعماق ودرجات الحرارة ، بجانب المؤشرات الكيماوية كالجوامد الذائبة والمغذيات ، بجانب المؤشرات البيولوجية لوفرة الغذاء الطبيعي كنموات البلانكتون والنباتات المائية الماكروسكوبية Macrophyte والحيوانات اللافقارية (والنباتات) القاعية Benthos .

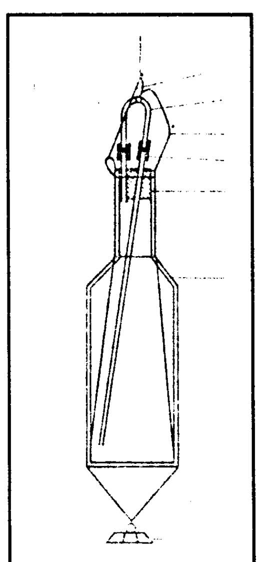
وقد يتطلب الأمر إجراء التقديرات مرتين في اليوم قبل وبعد التغذية ، أو يوميًا أثناء أو بعد التغذية ، أو أثناء تدفق المياة للحوض ، أو أسبوعيًا ، وذلك طبقًا للغرض من التحاليل، وقد يستمر تسجيل نتائج تحاليل مستمرة مزودة بوسائل إنذار عند وصول إحدى صفات الماء لمستوى حرج . وقد تستخدم المؤشرات البيولوجية دليلاً على جودة الماء ، سواء من نمو السمك ، وكفاءة تحويله الغذائي ، أو المادة العضوية في الماء ، أو محتواه من الكلورفيل ، أو لون وعكارة الماء ، أو مدى انتشار اللافقاريات الأرضية البسيطة Benthic Invertebrates .

في الماء المالح يستخدم مقياس الأوكسجين ومقياس الملوحة لتمييز النمو في الماء وتاريخه الطبيعي والبيولوجي ، ورغم ندرة حدوث انخفاض حرج في محتوى الأوكسجين في الماء المالح فهناك استثناء من ذلك في بعض المواقع الاستوائية . والفوسفات والنترات والسليكات أملاح هامة في البحار ، ويؤدي نقصها إلى تحديد الإنتاج العضوي في الماء ، وكمية هذه الأملاح الغذائية في مناطق ومواسم معينة تعطي مؤشرًا على خصوبة هذه المناطق والعمليات البيولوجية الحادثة . ونظرًا لضآلة الاختلافات بين الخواص الكيماوية في ماء البحر بالمسافة والزمن ، فهذا يتطلب دقة التحاليل في البيئة المالحة عنه في الماء العذب . ومحتوى الكلور من أهم التقديرات في الماء المالح لاستخدامها في استنتاج ملوحة وكثافة الماء ، وكذلك في تشخيص الكتلة الحية في الماء ، وبخاصة في بعض الحالات ، تدل على توزيع السمك وحيوية بيض وزريعة أسماك الأعماق .

بينما في الماء العذب عادة تقتصر الاختبارات على تقدير الأوكسجين ، ثاني أكسيد

الكـربون ، قلوية الفينـو لفثالين ، قلـوية برتقـالي الميثيل ، درجة تركيز أيون الهيدروچين (الحموضة PH) . فثاني أكسيد الكربون والحموضة ليستا من العومل المحددة للإنتاج العضوي في البيئة المالحة ، لكنهما غالباً من العوامل المحددة في الماء العذب .





(شكل ١٩) زجاجة جمع عينات الماء

أخذ العينة :

لاتؤخذ من الماء السطحي ، إذ لا تعبر عن الغازات الذائبة بشكل مثالي ، بل تؤخذ من الماء العميق بواسطة زجاجات عينات خاصة ، ذات أثقال تساعد على غطسها وهي فارغة ، وذات سدادة تفتح تحت الماء بعد بلوغ الزجاجة العمق المطلوب . وأواني أخذ العينات ينبغي ألا تتكون من المعادن بل زجاج ، وغطاؤها ينبغي ألا يكون مطاطاً أو من الفلين ، بل زجاج أو بلاستك (الأواني البلاستك تؤثر على تقدير الزنك والزجاج الصودا يؤثر في تقدير كل من الفوسفات والسليكات والكالسيوم) وعند تقدير السليكات تؤخذ عينات الماء في أواني من البوليثين وتغسل كل الأواني بغمسها في حامض هيدروكلوريك تركيز ١٠ ٪ لمدة يومين ، ثم غسيلها مرتين على الأقل بالماء ، بعدها تصير صالحة لأخذ عينات ماء التحليل، ونظراً لسرعة التغييرات الكيماوية في العينات ، خاصة في ارتفاع حرارة الجو؛ لذا تخلص العينات من المواد الذائبة بالترشيح ، وتجرى التقديرات بسرعة ، أو تحفظ العينة بطريقة مناسبة . والترشيح غير مناسب للعينات التي سيقدر فيها الغازات الذائبة والحموضة والكربونات . بينما الترشيح يعتبر أساسياً في العينات العكرة أو الغنية بالطحالب ؛ لإزالة التداخل في التقديرات الضوئية ، وإزالة البكتيريا والطحالب التي تضر بسرعة ، وتستهلك العناصر الغذائية في العينة ، خاصة الفوسفور الذائب . ويتم الترشيح بدون إعاقة على مرشحات ألياف زجاج (مثل وات مان GF/C) ، أو مرشحات غشائية مخلقة ذات سعة ثقوب محددة (مثلاً ٠,٤٥ ميكرومتر). ويتم غسيل المرشحات بالماء المقطر قبل استعمالها، أما المرشحات من الألياف الزجاجية فتحرق على ٥٠٠° م قبل استخدامها . وقد يفضل الترشيح في الحقل ، باستخدام دورق وقمع بخنر وورق ترشيح GF/C ، واستخدام طلمبة سحب على قمع بخنر لسرعة الترشيح (أو طلمبة أي منفاخ دراجة مقلوب الصمام للسحب فقط) .

أما حفظ العينة فيكون بالتجميد على درجة حرارة -١٥°م لوقف نشاط الكائنات الحية الدقيقة ، وتصلح لكل التحاليل عدا الغازات الذائبة والحموضة والقلوية والسليكات . ويتم التجميد في الحقل باستخدام إناء به ثلج جاف (ثاني أكسيد كربون صلب) وكحول ، مع عدم ملء أواني العينات بل يترك بها فراغ لتمدد العينة بالتجميد . وقبل إجراء التحاليل تسيح العينة تماماً على درجة حرارة الغرفة وترج . وقد تنقل العينات في صندوق تبريد من الحقل إلى المعمل ثم توضع في ثلاجة على درجة حرارة ٤°م لمدة بسيطة (ليلة) ، أو تجمد لمدة أطول . أما الحفظ الكيماوي فيجب إضافة المواد الحافظة مباشرة أو في ظرف ٢ ساعة على الأكثر وهي :

التحليل	المادة الحافظة
أوكسچين ذائب	دلائل وينكلر Winkler Reagents واطرد أي فقاعات
نترات، ثاني أوكسيد نيتروچين، أمونيا، كربون عضوي ، جوامد عضوية	٥ مل / لتر من حمض كبريتيك تركيز ٢ عيارى
حموضة ، ثاني أوكسيد كربون ، بيكربونات ، عسر ، قلوية	٥ مل / لتر من كلوروفورم واطرد الهواء واحفظ من الضوء
فوسفات معدني وعضوي	٥ مل / لتر من كلوروفورم أو ٥ مل / لتر من حمض كبريتيك ٢ عيارى
معادن نادرة	٥ مل / لتر من حمض نيتريك مركز

ولحفظ عينة الماء لتقدير الأوكسچين يمكن إضافة ٠,٥ مل من كل من محاليل يوديد البوتاسيوم القلوية وكبريتات أو كلوريد المنجنيز ، وبعد نصف ساعة يضاف حمض الكبريتيك وترج العينة .

كما يجرى حفظ العينات للتقديرات لمكوناتها الدقيقة أو لعناصرها النادرة التي تستخدمها الكائنات الدقيقة ، حتى يقف فعلها البيولوچي في العينات ، وتتوقف المادة الحافظة على طبيعة التحليل ، وعموماً يمكن إضافة نقط من الكلوروفورم .

هذا وينبغي تقدير الأمونيا والفوسفور الذائبين في نفس اليوم إذا أمكن لسرعة تمثيلهما أو ادمصاصهما . وتغلق أواني العينات جيداً منعاً من البخر .

التحليل الحقلي :

يفضل إجراء التحليلات البسيطة في الحقل وتتم بعدة طرق منها :

١ ـ المقارنة البصرية بين ألوان العينة المعاملة ومحاليل قياسية ذات ألوان مميزة وتركيزات معلومة .

٢ ـ استخدام أقراص ملونة قياسية لمقارنة العينة بها .

٣ ـ أجهزة قياس اللون بمرشحات تعمل بالبطارية الجافة ، وهي أدق من المقارنة البصرية ، والأقراص الملونة القياسية .

٤ ـ أجهزة تحمل إلكترودات لقياس الأوكسچين الذائب، وثاني أكسيد الكربون، وتركيز أيون الهيدروچين ، والملوحة ، والتركيزات العالية من الأمونيا ، ودرجة الحرارة ، وهي توفر الوقت كثيراً وأصبح استخدامها تقليدياً .

التحليل المعملي :

تستخدم القياسات اللونية في كثير من التقديرات المعملية ، وأساسها قياس تركيز اللون في المحلول كمياً، باستخدام جهاز قياس اللون Colorimeter أو المطياف Spectrophatameter ، وكلاهما يحتوي على مصدر ضوء ثابت يبعث لون (أو طول موجة ضوئية) يمتص بشدة في المحلول المختبر ، ويمر خلاله إلي كاشف خلية ضوئية Photocell Detector .

ويعبر عن التركيزات بوحدات منها :

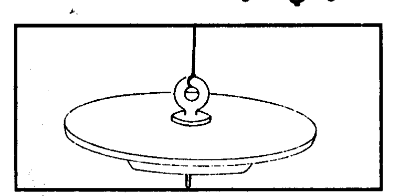
١ ـ مولاريتي Molarity أي الوزن الجزيئي بالجرامات مذابا في لتر ويرمز له بالرمز M أو $Mao\ l^{-1}$ ، وكذلك المللي مولار $mM = m\ Mol\ l^{-1}$ أي جزء على ألف من الوزن الجزيئي بالجرام في لتر ، أو الميكرومولار $uM = u\ Mol\ l^{-1}$ أي جزء على مليون من الوزن الجزيئي بالجرام في لتر . وبضرب التركيز المولاري في الوزن الجزيئي بالجرام يعطي الوزن المذاب بالجرام في لتر .

٢ ـ مكافئ كيماوي Chemical Equivalent أي الوزن المكافئ بالجرامات في لتر ، وكذلك ملي مكافئ $(m\ eq)\ l^{-1}$ أي جزء من ألف من الوزن المكافئ في لتر . كما تستخدم العيارية Normality ويشار إليها برمز N وهي كذلك وزن مكافئ في لتر للأحماض والقلويات .

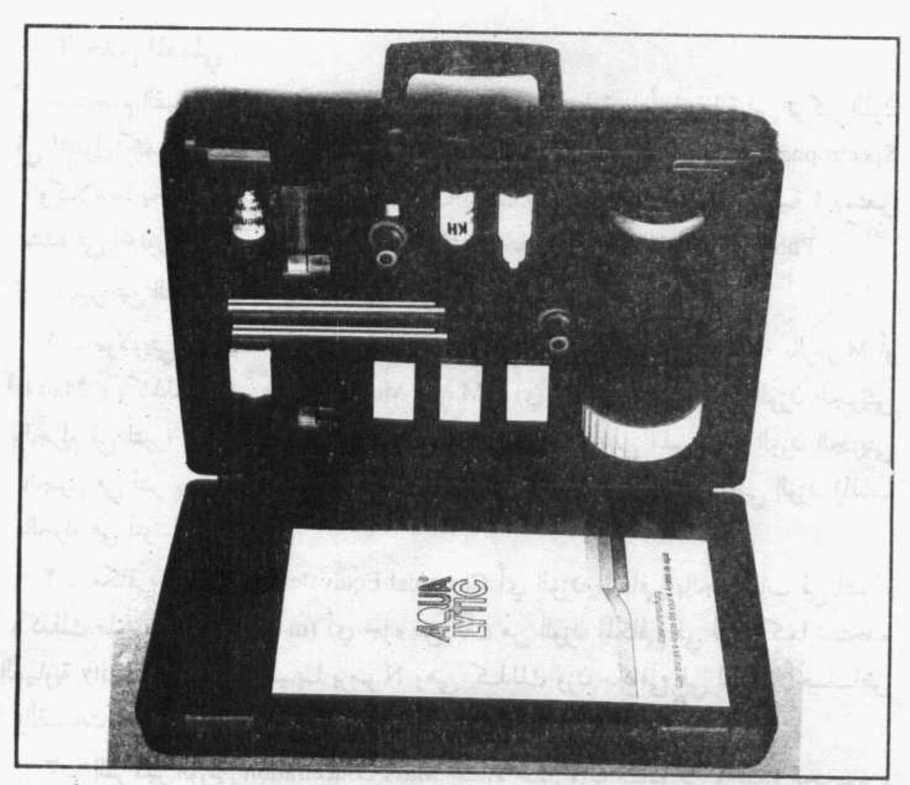
٣ ـ التركيز الوزني Mass Concetration عبارة عن وزن مادة في وحدة الحجوم ، مثلاً مجم / لتر = ميكروجرام / مل = جم / م^{3} تقارب جزءا في المليون (ppm) ، وميكروجرام / لتر = مجم / م^{3} تقارب جزءا في البليون (ppb) ونظراً لأن كثافة الماء النقي على درجة حرارة ٢٠°م تساوي ١,٠٠٠ جم / سم^{3} ، فلتعديل التركيز من مجم / لتر إلى جزء في المليون لابد من تعديل حجم الماء إلى وزن بالضرب في كثافة الماء التي تختلف عن الوحدة باختلاف درجة الحرارة عن ٢٠° م ، أو بوجود ملوحة ، فمثلاً ماء البحر ذو ملوحة ٣٥ ٪ على ٢٠° م تكون كثافته ١,٠٢٥ جم / سم^{3} ، فتركيز أي مكون ١٠ مجم / لتر = ١٠ مجم / ١٠٢٥ جم ماء

= ١٠ / ١٠٢٥٠٠٠

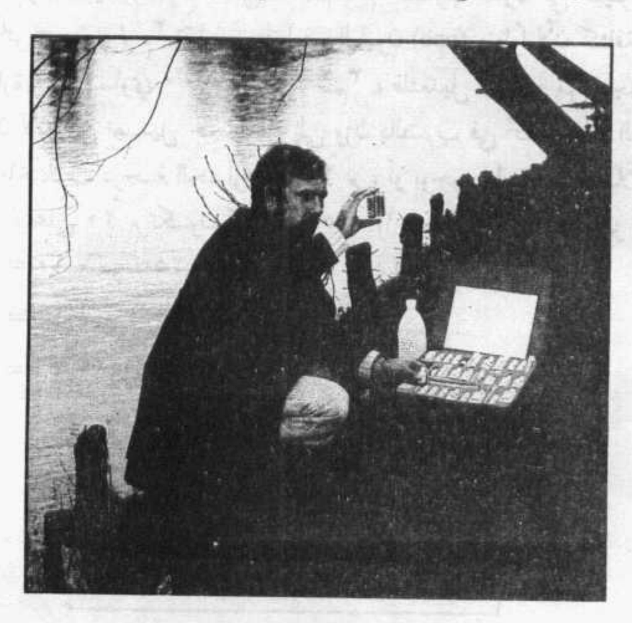
= ٩,٧٦ جزء في المليون .



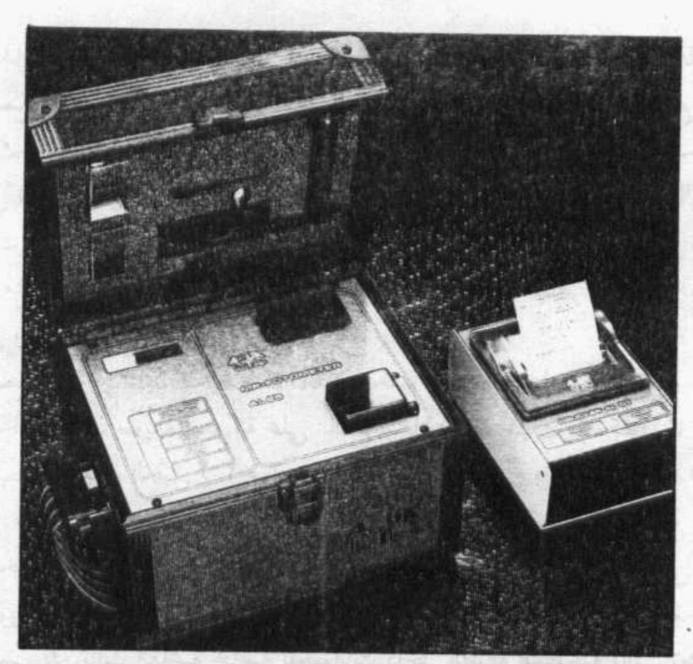
(شكل ٢٠) قرص سيشي Secchi لتقدير الشفافية



(شكل ٢١) نموذج لحقيبة تحليل المياه التي تصمم مكوناتها حسب الطلب



(شكل ٢٢) التحليل الحقلي للمياه



(شكل ٢٣) جهاز قياس اللون محمول في حقيبة للعمل الحقلي والمعملي لتقديرات المياه المختلفة

أي للتحويل من مجم / لتر إلى جزء في المليون يقسم التركيز مجم / لتر على كثافة الماء (ففي المثال السابق = ٩,٧٦ جزء في المليون) .

وهناك تقديرات (أزوت ، الأمونيا ، فوسفات) تتوقف على درجة تركيز أيون الهيدروچين ودرجة الحرارة ؛ لذا ينبغي تقديرها في الماء عند إجراء هذه التقديرات كالأمونيا الكلية فيسهل حساب الأمونيا غير المتأينة الأشد سمية . كما أن تقدير درجة الحرارة للماء هام عند تقدير تركيز الكلور Chlorosity في ماء البحر بالجرام كلور / لتر ، إذ منها يمكن استنتاج الملوحة من جداول قياسية إذ أن تركيز الهالوچينات Chlorinity (تركيز الكلور والبروم واليود في كيلو جرام ماء بحر) والملوحة يعتمدان على الكثافة .

$$\text{Chlorinity } \% = \text{Chlorosity}_T / \text{Density}_T$$

حيث T درجة الحرارة وعادة ٢٠° م .

وعادة يعبر عن العناصر الغذائية والعناصر النادرة في ماء البحر بتركيز الذرات أي ميكروجرام ذرى فوسفور (مثلا) / لتر ، وإذا ضرب هذا التركيز في الوزن الذري للعنصر يعطي التركيز للعنصر في اللتر .

ب ـ الكائنات المائية :

قد يتطلب الأمر دراسة السوابح (كائنات مائية تسبح في الماء) Nekton كالأسماك

وغيرها ، وهذا يتطلب جمع عينات منها ، سواء بالشباك التجارية (شباك الصيد العادية) ، أو أدوات جمع خاصة مثل مجرفة السمك الصغيرة أو شباك البلانكتون لجمع عينات يرقات سمك أو البلانكتون ، كما تستخدم المحاريث والجرافات السريعة لصيد الحيوانات السابحة التي تقضي جزءاً من حياتها في القاع ، ويجب تسجيل تفاصيل أدوات الصيد أو جمع العينات ، والموقع ، عمق الماء ، وقت الصيد ، بجانب ملاحظات عن مظهر السوابح وسلوكها (مثلاً في أفواج ، طيارة ، ثدييات) ، بجانب تسجيل مظاهر البيئة المأخوذ منها العينة (مثل وجود حشائش عائمة ، لون المياه) .

١ ـ ولجمع عينة كائنات قاعية Benthos تستخدم مجرفة أو هلب أو خطاف سريع ، وذلك لصيد الحيوانات سريعة الحركة على القاع أو باستخدام شبك بلانكتون قاع ، مع عمل حساب زيادة طول الحبل (٣ مرات ضعف عمق الماء) ، والتأكد من أن الزحافة تجرف القاع ، والقاع غير الجيد يتطلب مهارة لجمع العينة وإلا تفقد أدوات جمع العينة . هذا وقد تستخدم كاميرات وعدسات تليفزيونية تحت الماء لفحص Epifauna ، وهي تمكن من رؤية صور الطبيعة لسطح الرواسب ولعشائر الحيوانات عليها ، لكن لا تمكن من الفحص الكمي للكائنات القاعية خاصة للحيوانات داخل الطبقة السطحية والتي تعتبر أهم الكائنات القاعية في تغذية الأسماك ، وللدراسات الكمية على الكائنات القاعية تستخدم مختلف الخطافات أو الكباشات Grabs مثل كباشة Petersen وكباشة Van Veen والتي تعمل في مساحة ١,٠ أو ٢,٠ م^{2} ، والكباش الحلزوني من أكثرها سعراً وتعقيداً في العمل.

عند وصول عينة القاع إلى السفينة تغسل خلال مجموعة مناخل أو غرابيل ، عادة ذات فتحات بقطر ٢ ، ١ ، ٠,٥ ، ٠,٢ سم بعد أخذ عينة مجمعة حوالي ٥٠ جم وزن رطب لدراسة الرواسب . ثم تجمع الحيوانات من على الغرابيل وتحفظ في كحول ٦٠٪ أو فورمالين ٤٪ ، ويسجل على الأواني التاريخ ، الموقع ، عمق الماء ، مساحة الكباش ، حجم العينة ، نوع الرواسب ، المادة الجافة ، لحين التعرف عليها نوعاً وعدداً ، كما تقسم من حيث أهميتها لتغذية السمك بناء على معرفة سابقة لمحتويات أمعاء السمك .

ولعمل مسح أولي للكائنات القاعية في مساحة صيد محدودة يتطلب أخذ حوالي ٢٠–٧٠ عينة قاع لمعرفة صورة تقريبية عن توزيع هذه الكائنات كمياً ونوعياً .

٢ ـ وللتحليل الخضري في الماء يتطلب عمل كثير من المواقع لرسم خريطة خضراء للمسطح المائي بما يحتويه من نباتات طافية أو ظاهرة أو غاطسة وبالأعداد التي يحددها الفني القائم بالتحليل والتحكيم ، وكل موقع في البحيرات يفضل أن يكون ١٠×١٠م ، بينما في الجداول يكون شرائح بطول ٣م ، ويسجل العمق الموجود عليه النبات ، والحالة الموجود عليها إن كان مبعثراً أو متوسط الكثافة أو كثيفاً ، كما يسجل حالة التزهير

والإثمار، ولجمع عينة من النباتات يختار النبات المتوسط ، وبخاصة إذا كان مثمراً أو مزهراً، وإذا أمكن كذلك جمع الجزء تحت الأرضي مع الأجزاء الأخرى للنبات ، والنبات الكبير يمكن حفظه مجزأ أو مطوياً عدة ثنيات مع تسجيل ارتفاع النبات ، يحفظ النبات بين طيات ورق جرائد مع تسجيل كل البيانات على النبات وعلى ورق الصحف ، يضغط النبات بورق الصحف لمدة ٤-٦ ساعات أو ليلة ويستبدل ورق الصحف الرطب بآخر جاف، واعمل على تهوية العينات ، ربما يتطلب التجفيف يوماً آخر . يتم التعرف على أنواع النباتات ووفرتها وبياناتها .

٣ ـ الطيور المائية : يفيد تسجيل وفرة وسلوك الطيور المائية في اكتشاف المصايد وتحديد مواقع الصيد ؛ لذا تسجل ملاحظات عن الموقع والزمن ، أنواع الطيور ، غزارتها ، اتجاه حركتها ، وجودها منفردة أو في أسراب ، نوع وحجم الأسراب ، العوم أو الطير ، التغذية على السمك ، نشاط الغطس وغيرها .

٤ ـ السمك : لأخذ عينات السمك عادة تستخدم أدوات صيد غير تجارية ، إذ تستخدم أجهزة بحثية عادة في غير أوقات الصيد التجارية ، وتستخدم شباك البلانكتون لصيد بيض ويرقات السمك ، كما تستخدم شباك خاصة دائرية كل حسب الغرض المخصص لها .

لتحديد حجم عينة السمك المأخوذة للتحليل ، يقدر متوسط وزن السمكة بوزن ١٠ سمكات ، يحسب عدد السمك في اللوط بقسمة وزن اللوط على متوسط وزن السمكة ، ويستخرج من الجدول التالى عدد السمك اللازم أخذه كعينة للتحليل .

وقد تستخدم السموم أحياناً لجمع السمك في الماء الضحل ، خاصة فيما بين الشعاب والصخور القريبة من السطح ، كما قد تستخدم المتفجرات في ظروف معينة ، وإن كان ذلك محرم في كثير من الدول ، ويتطلب تصاريح خاصة من السلطات المسؤولة ، كما يتطلب معرفة باستخدامها وخطورتها .

ويجب عمل بطاقة بيانات لعينة السمك تشمل : موقع الصيد ومساحته ، وعمق الماء وطبيعة القاع ، والطقس وحالته ، والريح واتجاهه ، وقوته والبحر وحالته ولونه ، والتيارات ودرجة حرارة الماء والهواء ، والضغط الجوي ، والضوء وعمقه وقوته ، وأدوات الصيد من

عـــدد السمك في اللوط	متوســـط وزن الســـمك	
	أقل من ١ كجم عدد العينات	١ كجم أو أكبر عدد العينات
١٠٠ سمك فأقل	٥	٥
١٠١ – ١٣٠	٥	٦
١٣١ – ١٦٠	٥	٧
١٦١ – ١٩٠	٥	٨
١٩١ – ٢٢٠	٥	٩
٢٢١ – ٢٥٠	٥	١٠
٢٥١ – ٣٠٠	٦	١١
٣٠١ – ٣٥٠	٧	١٢
٣٥١ – ٤٠٠	٨	١٣
٤٠١ – ٤٥٠	٩	١٤
٤٥١ – ٥٠٠	١٠	١٥
٥٠١ – ٦٠٠	١١	١٦
٦٠١ – ٧٠٠	١٢	١٧
٧٠١ – ٨٠٠	١٣	١٨
٨٠١ – ٩٠٠	١٤	١٩
٩٠١ – ١٠٠٠	١٥	٢٠
١٠٠١ – ١٢٠٠	١٦	٢١
١٢٠١ – ١٤٠٠	١٧	٢٢
١٤٠١ – ١٦٠٠	١٨	٢٣
١٦٠١ – ١٨٠٠	١٩	٢٤
١٨٠١ – ٢٠٠٠	٢٠	٢٥
٢٠٠١ – ٢٢٠٠	٢١	٢٦
٢٢٠١ – ٢٤٠٠	٢٢	٢٧

عـــدد السمك في اللوط	متوســـط وزن الســمك	
	أقل من ١ كجم عدد العينات	١ كجم أو أكبر عدد العينات
٢٤٠١ – ٢٦٠٠	٢٣	٢٨
٢٦٠١ – ٢٨٠٠	٢٤	٢٩
٢٨٠١ – ٣٠٠٠	٢٥	٣٠
٣٠٠١ – ٣٢٠٠	٢٦	٣١
٣٢٠١ – ٣٤٠٠	٢٧	٣٢
٣٤٠١ – ٣٦٠٠	٢٨	٣٣
٣٦٠١ – ٣٨٠٠	٢٩	٣٤
٣٨٠١ – ٤٠٠٠	٣٠	٣٥
٤٠٠١ – ٤٢٠٠	٣١	٣٦
٤٢٠١ – ٤٤٠٠	٣٢	٣٧
٤٤٠١ – ٤٦٠٠	٣٣	٣٨
٤٦٠١ – ٤٨٠٠	٣٤	٣٩
٤٨٠١ – ٥٠٠٠	٣٥	٤٠
كل ٢٠٠٠ سمكة	٥ إضافي	٥ إضافي

نوع الشباك وأطوالها وفتحاتها ، والسفن والحبال وكميتها ، ومدة الصيد وتوقيته وعمقه ومحصوله ، وأهم الأنواع وأحجامها والعينة المأخوذة ، وملاحظات عن التلف الحادث من الصيد وسلوك السمك وغيرها .

كما تحدد في الماء العذب النباتات المائية وغزارتها ، العكارة ، لون المياة ودرجة حرارتها إلى غير ذلك .

وفي عينة السمك يحدد الأنواع ، متوسط طول السمك ، ومدى الأحجام ، الحالة الجنسية ، الأعداد .

هذا وقد تجمع عينات السمك من الصيد التجاري سواء من المراكب أو من الأسواق ، مع وجوب جمع بيانات عن تاريخ ومكان جمع العينات وجمع معلومات عن طريقة الصيد ومكانه ووقته .

وقد يتطلب الأمر جمع أعضاء أو أنسجة من السمك كما في جمع القشور لتحديد العمر والحساب الرجعي للنمو في السمك ؛ لذا تختار القشور من مناطق على السمك تختلف باختلاف الأنواع ، وعادة تؤخذ من الجانب بعيداً عن الخط الجانبي الذي يحتوي نسبة عالية جداً من القشور المتجددة ، فتؤخذ القشور من الثلث الأمامي من جسم الرنجة أو أعلي الخط الجانبي أو أسفل الزعنفة الظهرية ، ومن السمك المفلطح من جانب العين وغالباً من وسط الجسم . وإذا أمكن تغسل الأسماك أولاً لإزالة قشور الأسماك الأخرى التي قد تكون ملتصقة بها . ويؤخذ ١٠–٢٥ قشرة بواسطة ملقط أو مطواة وتوضع في مظروف صغير يرقم أو يكتب عليه بيانات السمكة (نوع ـ طول ـ وزن ـ مكان أخذ العينة) .

كما قد تجمع أحجار الآذان أحياناً لتقدير عمر السمك ، وهي تقع في رأس السمك كجزء من جهاز السمع ، وتستخلص بفتح الرأس وسحبها بملقط ، وطريقة الفتح تعتمد على نوع السمك وتحدد بالخبرة .

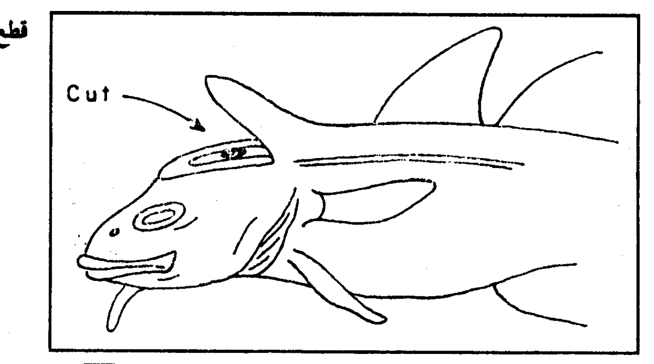
وأحياناً تجمع الأشواك أو الفقرات التي يحددها عالم البيولوجي لتحديد عمر السمك . ويجب حفظ الفقرات المختارة لهذه الدراسة في كحول ٦٠ ٪ أو كما يحدد الدارس .

ويجرى فحص المناسل (لتحديد حالة النضج الجنسي) في الحقل ، وتوزن المناسل في حالة طازجة ؛ لأنها تتغير بشدة بالحفظ ، وإن كان يمكن عد البيض في المناسل المحفوظة . وتنزع المناسل بفتح التجويف البطني بحرص ثم تحفظ في فورمالين ٤ ٪ ، ويدون عليها المعلومات الخاصة بحجم السمك وحالته .

وتفحص المعدة أو محتوياتها المحفوظة عقب وصول السفن ؛ لأن الإنزيمات تستمر في عملها على الغذاء في المعدة بعد موت السمك ، وتجمع المعدات بعشوائية سواء مملوءة أو

فارغة ، وتحفظ في فورمالين ٨٪ لوقف الهضم .

وتجمع الأقواس الخيشومية لدراسة الأنواع وتحفظ في كحول ٦٠٪ .



(شكل ٢٤) القطع في رأس السمك للحصول على حجر الآذان

ولحفظ عينات السمك يستخدم الفورمالين ٤٪ [جزء من الفورمالين التجاري ٣٧-٤٠٪ مع ٩ أجزاء ماء ، ويعادل بإضافة ١ جم كربونات كالسيوم / لتر] بوجه عام ، ويغمس السمك الأقل من ١٠سم ـ طول ـ كاملاً في الفورمالين ، بينما السمك ١٠-٣٠سم طول يعمل عدد فتحات ضيقة في الجدار البطني لأحد الجوانب قبل غمسها في الفورمالين ، والسمك الأطول من ٣٠سم يجب حقنه بالفورمالين المركز في عدة أماكن مع شق البطن في عدة أماكن .

كل العينات لابد من تدوين بياناتها عليها ، وتسجل ألوان العينات الطازجة القشور تحفظ جافة في أظرف ، أو تحفظ لمدة قصيرة (١-٢ أسبوع) في أنابيب بها ماء . وأحجار الآذان كذلك تحفظ جافة في أظرف أو في كحول ٦٠٪ لبعض الأنواع ، والفقرات تحفظ عادة في كحول ٦٠٪ ، والمناسل لاتحفظ ، وإذا اضطر لحفظها فيكون في فورمالين ٤٪ ، ولعد البيض فإن أفضل محلول حفظ هو محلول Gilson المتكون من :

١٠٠ مل كحول ٦٠٪

٨٨٠ مل ماء

١٥ مل حمض نيتريك ٨٠٪

٩ مل حمض خليك ثلجي .

بينما تحفظ معدة السمك في فورمالين ٨٪ ، والأقواس الخيشومية في كحول ٦٠٪ .

جـ ـ التربة :

طريقة أخذ العينة :

١ ـ يعمل قطاع بالأرض م × م × م وقد يتحدد العمق بالوصول إلى المياه أو طبقة صماء أو مادة الأصل .

ـ تؤخذ العينات من الجانب المظلل وكل عينة تمثل عمقاً أو طبقة .

ـ تعبأ العينة في أكياس ويدون عليها العمق والتاريخ والبيانات الظاهرية :

أ ـ عمق القطاع . ب ـ نظام تعاقب وسمك الطبقات .

جـ ـ قوام التربة تقريباً . د ـ بناء التربة .

هـ ـ بعد مستوى الماء الأرضي. و ـ وجود طبقات صماء .

ز ـ وجود تجمعات جيرية من عدمه .

ـ بعد أخذ العينات تخلط ويحضر منها عينة شاملة .

ـ تجفف العينات في الهواء وتعبأ في الأكياس أو برطمانات محكمة ويدون عليها البيانات كالرقم والتاريخ .

ـ عند الوصول إلى المعمل تفرغ من الأكياس ثم تطحن في هون خشبي وتستبعد الحجارة والزلط .

تنخل العينة في منخل ٢ م لاستبعاد الحصى ويؤخذ النازل من المنخل ثم يعبأ في برطمانات محكمة .

أدوات أخذ العينة :

ـ اسطوانة التربة . ـ بريمة التربة .

ـ مثقاب فرانكل . ـ الكباش .

الشروط الواجب توافرها عند أخذ العينة :

ـ إزالة المخلفات النباتية قبل الحفر .

ـ تؤخذ العينة والتربة جافة وألا تكون مروية .

ـ يجب ألا تكون الأرض مسمدة حديثاً .

ـ يجب أن تؤخذ العينات بشكل منتظم وعادة يحتاج ٥ كجم .

ـ يتوقف عدد العينات على حالة الاختلافات الظاهرية للتربة .

ثالثاً : الأغذية حيوانية الأصل :

وينظم قرار وزير الصحة رقم ٣٤٩ لسنة ١٩٨٦ الخاص بفحص رسائل المواد الغذائية

كيفية الحصول على عينات ممثلة للرسائل كالتالي :

١ ـ رسائل الأغذية المجمدة :

أ ـ اللحوم المجمدة وأجزاؤها : تؤخذ وحدة كاملة بنسبة ١ : ٢٠٠٠ وحدة حتى ١٠٠٠٠ الأولى ، ثم بنسبة ١ : ٥٠٠٠ وحدة حتى ١٠٠٠٠ الثانية ، ثم بنسبة ١ : ١٠٠٠٠ وحدة بحد أقصى عشرة وحدات للرسالة . والوحدة عبارة عن ربع ذبيحة بقر ، أو ذبيحة ضأن كاملة أو أجزاؤها حسب حالة ورودها ، أو كرتونة لحوم أو أكباد .

ب ـ الدواجن المجمدة وأجزاؤها : تؤخذ وحدة كاملة بنسبة ١ : ٥٠٠ وحدة للألف الأولى ، ثم بنسبة ١ : ١٠٠٠ وحدة للألفين التاليين ، ثم بنسبة ١ : ٥٠٠٠ وحدة للخمسة آلاف الثالثة ، ثم بنسبة ١ : ١٠٠٠٠ وحدة بما يزيد عن ذلك بحد أقصى عشرة وحدات . والوحدة عبارة عن كرتونة .

جـ ـ الأسماك المجمدة : تؤخذ وحدة بواقع ١ : ٢٠٠٠ حتى الأربعة آلاف الأولى ، ثم بنسبة ١ : ٥٠٠٠ بالنسبة للعشرة آلاف التالية ، ثم بنسبة ١ : ١٠٠٠٠ فيما يزيد عن ذلك بحد أقصى عشرة كرتونات (وحدات) .

٢ ـ رسائل الأغذية غير المجمدة :

تسحب عينات بنسبة ٥ : ١٠٠ من المائة عبوة الأولى ، ثم بنسبة ٣ : ١٠٠ لكل مائة عبوة تالية حتى ٣٠٠ عبوة ، ثم بنسبة ١ : ١٠٠ لكل مائة عبوة تالية حتى الألف عبوة ، ثم بنسبة ١ : ١٠٠٠ من كل ألف أو جزء من الألف التالية .

رابعًا : إخراجات الجسم وسوائله :

تتأثر قيم التقديرات المختلفة في إخراجات الجسم وفي الأنسجة البيولوجية طبقًا لمكان أخذ العينات ، وقت أخذ العينات ، مدى تمثيل العينة ، حالة الحيوان من حيث تغذيته وصحته ومعاملته وإذا ما كان واقعًا تحت ضغوط متباينة .

فالدم قد يؤخذ من أوردة الأذن والذيل والجناح والعنق والساق ، أو من القلب مباشرة (في الكتاكيت والفئران) ، حسب نوع الحيوان ، وحجم العينة المطلوبة للتحليل .

وسائل الكرش ينبغي خلطه قبل سحبه ، وعلى أن يسحب من مواقع واتجاهات وأعماق مختلفة من الكرش ؛ لاختلاف تراكيبه باختلاف مكان العينة . والبول غالبًا يؤخذ الخرج اليومي لتحليله ، وتنسب مكوناته كتركيزات للكمية الخارجة في اليوم من البول . كما تؤخذ عينات اللبن من كل حلبة على حدة أو من عينات ممثلة للحلبتين كما تؤخذ عضلات الصدر والورك في الدواجن للتحليل ، أما في الماشية فتؤخذ عينات من عضلة معينة ولتكن العضلة العينية ، وفي السمك تؤخذ العضلات المأكولة ، أو السمك ككل ، على أن ينص في طرق التحليل على مكان العينة ، وإذا ما كانت جافة أم طازجة، منزوعة

الجلد أم لا ، منسوبة للوزن الكلي أم الوزن كمادة عضوية وهكذا . كما أن استخدام بعض المهدئات أو مواد التخدير قبل سحب عينات الدم من الحيوانات يؤثر على بعض مكونات الدم ، فيتحرى الدقة إذا استخدمت هذه العقاقير ، ومعرفة تأثيراتها سلباً أو إيجاباً على مكونات الدم ، ووظائف الأعضاء ، كي نحصل على قيم حقيقية لتركيزات مكونات الدم ومعرفة صورته الحقيقية .

ووقت أخذ العينة سواء للدم أو سائل الكرش بالنسبة لوقت التغذية من الأهمية بمكان ، إذ تتغيركثيراً جداً مكونات سائل الكرش بمرور الوقت بعد التغذية ، بينما تتغير تركيزات بعض مكونات الدم لحد ما بعد التغذية عنه قبلها (بالصيام) . كما يختلف تركيب لحوم الأسماك المغذاة عن الأسماك الصائمة (في موسم تناسل أو في الشتاء) .

كما قد تتغير بعض مكونات الدم باختلاف الحالة التناسلية أو الفسيولوچية أو الغذائية للحيوانات ، ومنها الهرمونات والڤيتامينات والمعادن وغيرها . وتتغير كذلك مكونات اللبن لحد ما بتغيير نظام تغذية الحيوان ، وبالفترة من موسم الحليب أي بحالة الحيوان الغذائية والفسيولوچية .

هذا وتتأثر مكونات الأنسجة البيولوچية بالتخزين ، فاللحم مثلاً عقب ذبح الحيوان مباشرة يحتوي ٧١٤مجم٪ جليكوچين ، ٢٨٣ مجم٪ حمض لاكتيك وتكون حموضته PH ٦,٨٢ بينما بعد ٢٤ ساعة ينخفض الجليكوچين إلى ٨٢ مجم٪ و PH إلى ٥,٩٤ ويزداد حمض اللاكتيك إلى ٧٤٣ مجم٪ ،كما تقل قدرة اللحم على حفظ مائه ، وتقل مقاومته الكهربية ، ويتغير لونه بعد الذبح ، وذلك للتغييرات الكيماوية الحيوية والتغييرات في التركيب الليفي للحم ، والتي تحدث بعد الذبح ، وأثناء التيبس الرمي Rigor Mortis . وبعد فترة التيبس هذه تصير اللحوم أكثر طراوه ، وترتفع قيمة رقم الحموضة ، وتزيد قدرة حفظ الماء ، وتنشأ تغييرات نسيجية بفعل الإنزيمات المحللة للبروتينات .

١ ـ البـول :

تشير مكونات البول الكمية (كما هو فى الدم كذلك) إلي حالة وظائف الجسم ، والتي تتوقف على الحالة الغذائية والمرضية والفسيولوچية للحيوانات ، ولتحليل البول يجمع البول المستخرج على مدار ٢٤ ساعة إذ تنسب عادة مكونات البول كتركيز بالمليجرام / يوم أي للبول المفرز في ٢٤ ساعة ، وقد تحلل العينات طازجة لبعض المكونات (مثل الحموضة الحقيقية أو تركيز أيون الأيدروچين والكثافة النوعية ، أو تحلل في عينة ٢٤ ساعة مضافاً إليها بعض المواد الحافظة ، كنقط قليلة من الفورمالدهين المركز (٤٠ نقطة / لتر) ، أو حمض الكبريتيك ، أو زيت معدني أو التولوين (طبقة رقيقة) بشرط ألا تتداخل المادة الحافظة مع التقديرات محل الدراسة .

وقد يفحص البولي نوعياً أو كمياً ، فالفحص النوعي يشمل حجم البول ولونه وعكارته ورائحته وكثافته النوعية ، وفحصه ميكروسكوبياً ، كما يتطرق الفحص النوعي للبول إلى اختبارات نوعية متعددة للكشف عن مكوناته العضوية المختلفة . وقد يفحص البول كذلك بكتريولوچيا ، بينما تشمل التحليلات الكمية للبول ، تقدير الحموضة المعايرة ، والحموضة الحقيقية ، والجوامد الكلية ، والمكونات النيتروچينية المتعددة ، والأحماض العضوية المختلفة، والمركبات العضوية وغير العضوية المتباينة ، والهرمونات والإنزيمات واختبارات وظائف الأعضاء (كالكلى) .

لون البول يتعلق بتركيز ونوع المواد المستخرجة فيه ، فاللون الأصفر الفاتح حتى الأصفر الذهبي هو لون طبيعي ، بينما البول عديم اللون حتى الأصفر الباهت أو المخضر دليل التهاب كلى مزمن وقلة البول أو مرض السكر ، واللون الليموني لخروج مواد معينة مثل يروبيلين أو إكريفلافين ، واللون الأصفر البرتقالي نتيجة فقد السوائل بالعرق والإسهال والقيء والحمى وخروج قليل من البول معه يروبيلين وبيرازولون وكاروتين ، واللون البنى البرتقالى أو المحمر ناتج من الكريساروبين وارتفاع محتوى اليورات ، واللون الأحمر لزيادة تركيز اليوريثرين والدم والهيموجلوبين والميوجلوبين والبورفيرين والبيراميدون والانتى بيرين وألوان إنيلين والميركروكروم والدرنات الحمراء ، واللون البني إلى البني الداكن راجع للبيلروبين والهيموجلوبين والبورفيرين والأجسام الفينولية ، واللون البني المسود للهيموجلوبين والملانين والكابتون والكاربول والليسول وحمض السالسيل ، واللون الأخضر راجع للبيليفيردين وأزرق الميثيلين والانديجو كارمين وحمض الكاربوليك ، واللون الأزرق من أزرق الميثيلين والانديجوكارمين ، بينما اللون البنى لوجود الدهن أو الصديد .

وقد تشير عكارة البول التي تذوب بالتسخين إلى وجود أملاح حمض اليوريك ، وزيادة العكارة توضح وجود بروتين أو كاربونات أو فوسفات . أما العكارة التي لا تذوب بالتسخين لكن تذوب بإضافة نقط حمض خليك ١٠ ٪ فتشير إلى وجود الفوسفات أو الكاربونات ، وإذا ذابت في مليلترات حمض هيدوركلوريك ١٢,٥ ٪ فتكون أوكسالات أو ليوسين أو تيروسين أو سيستين ، وإذا ذابت في مليلترات صودا كاوية ٢٠ ٪ فتكون حمض يوريك أو مخاط أو سيستين ، وإذا كونت لوناً أحمر يترسب تشير إلى الدم ، وإذا كونت جلطة چيلاتينية كانت صديداً ، وإذا ذابت في مخلوط كحول / أيثير كانت دهوناً .

إن اتجاه البول إلى الحموضة المرضية قد ينشأ عن حالة جوع ، أو امتصاص البروتين عن غير طريق القناة الهضمية (هدم الجسم) ، أو حالات الحميات والحموضة . بينما قلوية البول المرضية قد تنشأ عن تخزين البول ، أو إصابة بكتيرية ، أو لوجود حصوات في المثانة ، أو من تناول عقاقير قلوية .

وزيادة إخراج البروتين في البول عادة تكون مصاحبة لزيادة استهلاك البروتين فى العليقة أو لأمراض في المجاري البولية ، كالالتهابات نتيجة الحصوات ، أو حالات الحميات أو قصور الدورة الدموية بينما نقص البروتين ينشأ لأسباب كلوية ، كالتهاب الكلى الحاد وأمراض الكلى المزمنة .

صبغات الصفراء (وتشمل البيليروبين واليروبيلينوچين) في البول تشير إلى أمراض الكبد ، ونقصها يصاحب حالات الإسهال ، واضطرابات إعادة امتصاصها في الأمعاء .

ووجود الجلوكوز في البول دليل الإصابة بمرض السكر ، ويجب تكرار التقدير للتأكد من ذلك ، مع إجراء اختبار تأكيدي آخر كالكشف عن الأجسام الكيتونية . وقد يصاحب مرض السكر أيضاً التهاب الكلى .

وقد يصاحب بعض الأمراض إفراز الهيموجلوبين الحر أو كرات الدم الحمراء أو الميوجلوبين في البول ، وللتأكد من ذلك ينبغي تحليل الدم ، وفحص الترسيب كذلك كاختبارات تأكيدية ، وظهور هذه المواد في البول سببها أمراض الكلى ، والمجاري البولية ، والأعضاء المتعلقة بالجهاز البولي التناسلي ، وغالباً مع التهاب المثانة ، وكذلك في حالات أنيميا ماشية اللبن ، وعند التغذية على البرسيم الحجازي والبسلة .

والأنديكان هو ناتج عملية تحلل التربتوفان إلى إندول وأكسدته في الكبد إلى أنديكان يفرز في البول ، وزيادته في البول يصاحب حالات التهاب الأمعاء والمغص المعوي الحاد ، ووجود أجسام غريبة في الأمعاء وانسداد الأمعاء . بينما نقص إخراجه في البول يرجع للفشل الكلوي .

وظهور الأجسام الكيتونية في البول دليل اضطرابات في ميتابوليزم الكربوهيدرات ، وزيادة هدم الدهون ، وهو اختبار تأكيدي كذلك (مع الكشف عن سكر البول) في تشخيص الإصابة بمرض السكر . وقد تظهر الأجسام الكيتونية في البول ، ويرافقها زيادة الأحماض الدهنية الحرة في دم الحيوانات العشار أو عالية الإدرار ، لزيادة نشاط الإنزيمات المحللة للدهون ، في حالات عدم تغطية الجلوكوز لاحتياجات الطاقة ، أو لنقص جلوكوز العليقة ، وقد تنشأ عن بعض المراعي ، أو لحالة الجوع الطويل .

وتحليل البول من حيث محتواه من الماغنسيوم يدلل على حالة الحيوان الغذائية من هذا العنصر ، فنقصه في بول البقر عن ١ جم / يوم دليل نقصه في الدم كذلك . ونقص ماغنسيوم الدم في الماشية والغنم مرض خطير ، إذ يؤدي إلى حمى (كزاز) تنتهي بالنفوق نتيجة نقص ماغنسيوم العليقة ، والخطورة أشد للحيوانات العشار والحلابة ؛ لزيادة احتياجاتها من الماغنسيوم، وقد ينشأ نقص ماغنسيوم الدم كذلك في أمراض الأمعاء المزمنة.

ولحفظ البول المجمع طوال ٢٤ ساعة من التغييرات التي قد تطرأ عليه فيتم حفظه

باستقباله على ١٠ مل حمض هيدروكلوريك مركز تكفي لعينة ٢٤ ساعة من البول ، أو أن يستخدم لنفس الغرض ٥٠ مل من نفس الحمض لكن تركيز ٢ عياري ، وهذا مناسب في تقديرات اليوريا والأمونيا والنيتروچين الكلى والكالسيوم ، لكن يترسب حمض اليوريك؛ لذا ترج العينة قبل أخذ العينة للتحليل .

كما يستخدم الثيمول (سواء بلورات قليلة أو ٥ مل محلول ١٠٪ في أيزوبربانول) لحفظ البول ، ويصلح هذا البول لتقديرات الصوديوم والبوتاسيوم والكلور والبيكربونات والكالسيوم والفوسفور واليوريا والأمونيا والأحماض الأمينية والكرياتين والكرياتينين والبروتينات والأجسام الكيتونية والأميلاز .

وقد يستخدم الفورمالين (٣-٤ نقط / ١٠٠ مل) وإذا زاد تركيزه أثر إيجابياً على تقدير الجلوكوز ، كذلك الكلوروفورم كمادة حافظه للبول يؤثر على تقدير الجلوكوز . ولتقدير حمض الأسكوربيك في البول يتم حفظه بأي من ١٠٪ حمض خليك أو ٥٪ حمض ميتافوسفوريك .

٢ ـ الروث :

عند فحصه مباشرة فلا يضاف مواد حافظة . وقد يجفف الروث مباشرة في فرن على حرارة منخفضة أو على حمام مائي ، أو أن يحفظ في ثلاجة ، أو أن يخلط مع كم معلوم من الماء ويحفظ في ثلاجة للتحليل فيما بعد ، وإذا كان سيقدر فيه النيتروچين فيحفظ بإضافة الحامض ، بأن يخلط الروث مع ٢٠٠ مل ماء جيداً ثم يؤخذ حجم معين من هذا المخلوط ويضاف إليه حجم مساوى من حمض الكبريتيك المركز ، ويؤخذ من هذا المخلوط المحمض قدر بسيط للتحليل . هذا ويمكن حفظ الروث كذلك بإضافة كمية بسيطة من الفورمالين . ويلاحظ أن أفضل هذه الطرق في الحفظ يتوقف على التقدير المطلوب إجراؤه في الروث ، فلتقدير الصبغات (يروبيلينوچين) يحفظ الروث بكبريتات الحديدوز القلوية ، بينما لتقدير النيتروچين يحفظ الروث في ثلاجة ولا يجفف ؛ لأن التجفيف يصاحبه تطاير لجزء من النيتروچين ، فيكون التقدير أقل مما هو موجود بالعينة الأصلية ؛ لذا يقدر النيتروچين في روث طازج أو محمض أو محفوظ في ثلاجة .

٣ ـ محتويات الكرش :

يجمع سائل الكرش من مواقع مختلفة ، وأعماق متباينة (من الفتحة المستديمة بالكرش أو باستخدام اللى المعدي) من الكرش في آنية زجاجية باستخدام الشفط الهادئ (بالفم أو بآلة خاصة كالمسدس أو منفاخ يعمل كمضخة ماصة كابسة) ، وذلك قبل الوجبة الصباحية مباشرة وبعدها بساعتين ، أربعة ، ستة ، وثمانية ساعات . يرشح سائل الكرش على طبقتين من الشاش على قمع على فوهة الآنية الزجاجية (التي يصلها تيار من

ثاني أوكسيد الكربون ، وموضوعة في جردل به ماء دافئ ٤٢° م ؛ ليوفر ظروف الكرش الطبيعية من حرارة ووسط لاهوائي) . يكون سائل الكرش معدا بذلك للقياسات المختلفة مثل عد البكتريا والبروتوزوا تصنيفهما ، قياس درجة تركيز أيون الأيدروچين ، والفعل المنظم، وتركيز الأمونيا ، والأحماض الدهنية الطيارة .

ويمكن تقدير مكونات سائل الكرش مثل الحموضة المعايرة ، والكلور ، وخلافه بنفس طرق تقديرها في الماء ، مثل طرق Visocolor Test التي تعتمد على المحاليل سابقة التحضير Kits .

وتقدر درجة تركيز أيون الأيدروچين ، أو قيمة PH سائل الكرش بالقياس المباشر بجهاز PH ، أو باستخدام الدلائل المختلفة في صورة محاليل أو ورق PH . والقيمة الطبيعية تنحصر بين ٦,٢ و ٧,٥ ونقصها عن ٦ دليل حموضة الكرش ، وبانخفاضها عن ٥ تقل قدرة الكرش على الاختزال جداً .

أما القدرة التنظيمية Buffering Capacity فهي عبارة عن عدد مللي مكافئات حمض الهيدروكلوريك ، اللازمة لتوصيل PH ١٠٠ مل سائل كرش إلي PH ٤,٥ .

أمونيا سائل الكرش تقدر بانحلال أزوت الأمونيا تحت ظروف قلوية ، ويمتص هذا الأزوت في حمض بوريك ، الذي يعاير بحمض الكبريتيك المخفف عيارية ٠,٠١ .

والأحماض الدهنية الطيارة الكلية Total Volatile Fatty Acids (VFAs) تقدر بعد تحميض سائل الكرش بحمض أورثوفوسفوريك مركز وحمض هيدروكلوريك عيارية ٠,١ ، وتقطر الأحماض الدهنية الطيارة بالبخار من حجم معلوم من العينة ، باستخدام جهاز الميكروكلداهل بضبط معدل التقطير في حدود ١٠٠ مل / ٧-١٠ دقائق . ويقدر تركيز الأحماض الدهنية الطيارة بمعلومية كمية الصودا الكاوية عيارية ٠,٠١ اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الطيارة في المتقطر .

٤ ـ الدم :

للحصول على البلازما ينبغي أن تحتوي أنابيب جمع الدم على مانع تجلط Anticoagulant بتركيز ٠,٢ مجم هيبارين / مل دم (٥٠ - ٧٥ وحده / مل دم) ، أو ٥ مجم / مل سترات ليثيوم أو سترات صوديوم ، أو ١-٢ مجم / مل أوكسالات ليثيوم أو إكسالات صوديوم أو إكسالات بوتاسيوم .

وينبغي في مانع التجلط ألا يحدث تحلل في الدم وألا يضيف للدم زيادة من العنصر المقدر . يطرد الدم مركزيا بسرعة قدر الإمكان لمدة ١٥-٢٠ دقيقة على ٢-٢,٥ ألف لفة / دقيقة .

اسحب البلازما بماصة إلى أنبوبة أخرى نظيفة للتحليل أو للحفظ بالتجميد ، ولتحليل

المعادن يؤخذ ١ مل بلازما إلى أنبوبة بها ٩ مل حمض ثلاثي كلور وخليك تركيز ١٠ ٪ لترسيب البروتين ثم الطرد المركزي للفصل ، ويحفظ الراسب في ثلاجة أو بالتجميد للاستعمال فيما بعد ، أما باقي البلازما (الرائق) فيقدر فيه المعادن المختلفه في التو أو فيما بعد كذلك .

ويحضر المحلول المانع للتجلط بإحدى طريقتين :

أ ـ تضاف الكمية المناسبة من المادة المانعة للتجلط إلى الأنبوبة التي يجمع فيها الدم وتخلط جيداً .

ب ـ يحضر محلول مركز من المادة في حدود ١٠ ٪ ويوضع في الأنبوبة كمية من المحلول تتراوح ما بين ٠,١ مل (أملاح إكسالات) إلى ٠,٢ - ٠,٥ مل (سترات) ، وتحرك الأنبوبة لتكوين غشاء رقيق على جدرانها ، ثم توضع في فرن تجفيف لتجف جيداً ، ثم يضاف إلى الأنبوبة كمية الدم المناسبة وتخلط ، وهذه الطريقة مناسبة للتقديرات الكمية في الدم ، ومن موانع التجلط كذلك يستخدم كل من حامض إيثيلين دي أمين تترا أسيتيك EDTA وأملاحه مثل ملح ثنائي البوتاسيوم أو ثنائي الليثيوم بمعدل ١٠-٢٠ مجم / مل دم ، وكذلك فلوريد صوديوم بمعدل ١٠ مجم / مل دم .

ويراعى عدم استخدام مانع التجلط الذي يتداخل مع التقدير المستهدف إجراؤه ، فمثلا أكسالات الأمونيوم لا ينبغي استخدامها عند استعمال الدم لتقدير الأمونيا أو اليورياز واليوريا والبروتين والأزوت غير البروتيني ، كما أن أملاح الفلور سامة للإنزيمات .

ولا ينبغي زيادة كمية مانع التجلط وإلا تؤثر على توزيع الماء بين الخلايا والبلازما ، وتؤثر على بعض التقديرات .

ويفصل السيرم بسحب الدم في أنابيب بدون مانع تجلط ، ويترك ليتجلط ، ويتجمع كمية مناسبة من السيرم (عادة أقل من ٨ ساعات) يتم نقلها إلى أنابيب أخرى نظيفة ينزع بروتين جزء من السيرم (كما سبق مع البلازما) ويحتفظ برائق السيرم بالتبريد أو التجميد لتحليل المعادن النادرة أو الدقيقة .

عينات السيرم ذات اللون الأحمر الوردي دليل تحليلها ، وعدم قبولها لتحليل المعادن خاصة الحديد والزنك والماغنسيوم والبوتاسيوم التي تكون مرتفعة القيم في هذه العينات . العينات شديدة التحلل تحتوي قيم فوسفور أعلى من الواقع .

٥ ـ السائل المنوي :

يتم فحص السائل المنوي من حيث حجم القذفة ، ولونها ، وقوامها ، وكثافتها ، وحموضتها ، وقيمة الكاتاليز (التي تدلل على المحتوى الخلوي والميكروبي من كرات بيضاء وحمراء وبكتريا وخلافه) ، بجانب الفحص الميكروسكوبي لمعرفة حركة الحيوانات

المنوية ، وعدد الميت منها ، أو المريض أو الشاذ (وذلك بعد صبغ قطرة سائل منوي بقطرتين محلول إيوسين والتدفئة على ٣٥° م فتكون الحيوانات المنوية الحية مرئية) ، وتشمل التغييرات المرضية تغييرات في الرأس أو الذيل فتكون الرأس منفصلة أو مزدوجة ، وقد يزدوج الذيل أو ينعقد إلى غير ذلك .

وتقدر كثافة السائل المنوي باستخدام جهاز سبرميو دينسيميتر Spermiodensimeter بعد تخفيف السائل المنوي بمحلول ملح طعام فسيولوجي ، وتعد الحيوانات المنوية في عدد من الحقول ومنها تحسب الكثافة بالمليون حيوان منوي / م^{3} ، مع الأخذ في الاعتبار لمعامل التخفيف .

كما يتم تقدير وقت المقاومة بتخفيف ٠,٠٢ مل سائل منوي بمقدار ١٠ مل محلول فسيولوجي من ملح الطعام ، ووضع أنابيب منها في حمام مائي على ٤٠° م ثم فحص محتواها من الحيوانات المنوية على فترات لتحديد وقت المقاومة للحيوانات المنوية لهذه الحرارة ببقاء حيوان منوي حي واحد ، وهذا الزمن في المتوسط ٨٠-٩٠ دقيقة ، وفي أفضل سائل منوي قد يصل إلى ٢٠٠ دقيقة وأكثر . كما يفحص السائل المنوي بكتريولوجيا لمحتواه من مسببات الأمراض التي ينبغي أن يخلو منها .

أما الحركة للحيوانات المنوية فتقدر كحركة جماعية كلية ينبغي أن تكون جيدة ، حركة أمامية ينبغي ألا تقل عن ٧٠٪ ، حركة خلفية ودائرية (ينبغي ألا تزيد عن ١٠٪)، وحركة ثابتة في المكان (يفضل أن تكون قليلة) .

ويستخدم في تخفيف السائل المنوي أي من المخففات التالية :

١ ـ سترات الصوديوم ٢,٨ جم + جلوكوز ٢,٨٥ جم في ١٠٠ مل ماءً مقطراً وقد يضاف ١٠-٢٠٪ صفار بيض .

٢ ـ لبن فرز .

٣ ـ البيض الكامل .

٤ ـ صفار بيض + مخفف خالي السيترات (٣,٢ جم جلوكوز + ٠,٤٥ جم بيكربونات صوديوم + ١,٥ جم ليسثين + ٣,٠ جم صمغ أكاسيا ويكمل إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر) بنسبة ١ : ٥ .

٥ ـ مخفف جاف في أنابيب زجاج معقمة .

ويتم التخفيف عادة بنسب ١ : ٥٠-١٠٠ .

وللمزيد من التفصيل يرجع للمراجع الآتية :

– مجموعة التشريعات الزراعية بشأن علف الحيوان (الجزء الثانى) : الهيئة العامة لشؤون المطابع الأميرية (١٩٨٨) .

ـ مجموعة التشريعات الصحية الخاصة بمراقبة الأغذية الألبان والمواد الملونة والحافظة (الجزء الثانى) : الهيئة العامة لشؤون المطابع الأميرية (١٩٩٢) .

– محمد جمال الدين قمر (وآخرون) أساسيات فسيولوجيا الإنتاج الحيوانى – مطبعة التقدم – القاهرة (١٩٨٥) .

– وزارة الزراعة (١٩٦٨) تغذية الحيوان والدواجن – نشرة فنية رقم ١٠٣ الطبعة الثانية .

- Holme, D. J. & Peck, H. (1993) Analytical Biochemistry . 2 nd Ed, Longman, Printed in singapore .

- Horwitz, W. (1976) J. AOAC , 59 : 1197 .

- Kust, D. etal. (1954) Die Besamung beim Rind. Ferdinand Enke - Ver Lag, stuttgart .

- Merck, E. (1974) Klinisches Labor .12 . Auflage, Merck, Darmstadt

- Oser, B. L . (1979) Hawkos physiological Chemistry, 14 th Ed., Tata Mc Graw - Hill , New Delhi .

- Park, D. L . (1990) Int . Symp . & Workshop on Food Cont . Mycotoxins and Phycotoxins, Cairo .

- Ranganna, S. (1979) Manual of analysis of fruit and vegetable products . Tata Mc Graw - Hill , New Delhi .

- Soliman, M. K. & Abd El Moty, I . (1976) A modren approach to veterinary clinical & laboratory diagnosis. The Scientific Book Centre, Cairo .

- Stirling, H. p . (1985) Chemical and biological methods of water analysis for aqualturalists . Institute of aquaculture . Univ. of Stirling , Scotland .

- The Feeding Stuffs (Sampling and Analysis) Regulations 1982

(1982) . Agriculture 1982 No. 1144 . Her Majesty's Stationery Office, London .

- Wells, B. B. (1962) Clinical pathology, 3 rd Ed . Saunders, Philadelphia & London .
- West , T. S. & Nurnberg , H. W. The Late (1988) The determination of trace metals in natural waters . Blackwell Scientific Publications, Oxford .
- Wootton, I. O . P . (1974) Microanalysis in medical biochemistry, 5 th Ed., Churchill, London .
- Woyewoda, A. D. etal . (1986) Can. Tech . Rep . Fish. and Aquatic Sci . No. 1448 .

الفصل الرابع

تركيب وصفات الأعلاف والماء والأنسجة البيولوچية الأخري

أولاً: الأعلاف

تكون النباتات الجزء الأعظم من مواد العلف الحيوانية ، وتتعدد وتتنوع المركبات الحيوية بالأنسجة النباتية ، إلا أنه يمكن تقسيمها إلى مجموعات كبيرة كل منها تتميز ببعض الخصائص .

وقد قام رودريكس Rodricks, 1977 من إدارة الأغـــذية والأدوية Food and Drug Administration (FAD) في مؤتمر جمعية الكيمائيين الزراعيين الرسميين AOAC عام ١٩٧٦ بتقسيم أي غذاء باعتباره خليط من مركبات كيماوية إلى المركبات الكيماوية التالية :

١ ـ مركبات جوهرية في الغذاء : وهذه تشكل الجزء الأكبر ، ويحتوي كل الكيماويات التي يطلق عليها المواد الغذائية Nutrients ، وكذا عدداً كبيراً من مواد غير معروفة بأنها غذائية ، لكنها ربما ترتبط بطريقة ما بحياة النبات أو الحيوان الذي منه الغذاء ، بعض هذه المركبات غير الغذائية Non Nutrients في بعض الأغذية يعتبر ساماً ، وعليه فتعتبرخطراً على الصحة . ومن الناحية القانونية يعتبرالغذاء المحتوى بطبيعته على كيماويات سامة أنه محرم فقط أو ممنوع تداوله فقط إذا أدى محتواه من هذه الكيماويات إلى خطورة .

٢ ـ كيماويات تضاف للغذاء : وذلك لغرض معين كالإضافات الغذائية Food Additives ، والمضادات الحشرية Pesticides ، أو العقاقير Drugs المستخدمة في الحيوانات المنتجة للغذاء ، وهذه تحتاج اختبارات لتحديد مدى استخدامها في الأغذية ، وإذا كان هذا المدى آمنا . بعضها مأمون كالإضافات الغذائية ، وذلك راجع لتاريخ استخدامها بنجاح لمدة طويلة .

٣ ـ ملوثات : وتتضمن كيماويات دخلت على الأغذية لسبب عارض ، أو لتلوث بيئي عام ، أو لعمليات غير ملائمة ، أو بسبب نمو فطري أدى لتلوث الغذاء بكيماويات متخلفه عن الفطر . فإذا كانت أي من هذه الكيماويات الملوثة سامة فإنها تؤدي لخطورة على الصحة .

وجود أكثر من مادة سامة في الغذاء لا يعني أنه خطر على الصحة فهذا يتوقف على

محتوى الغذاء من هذه السموم ، أي يتوقف على تركيزاتها . كما يجب الأخذ في الاعتبار أن بعض هذه الملوثات لايمكن تفاديها كلية ، حتى مع اتخاذ إجراءات التصنيع الجيدة ؛ ولذا يجب الانتباه عند وضع إرشادات ومقررات السماح لمثل هذه المركبات .

المواصفات القانونية لمواد العلف :

تم إجراء العديد من التحاليل المختلفة لكافة مواد العلف ، ومنها أمكن الاستدلال على التركيب الغذائي لأي مادة علف سليمة خالية من التلف ، وعليها تم وضع مواصفات قانونية لمواد العلف المختلفة بنص قراري وزير الزراعة رقمى ٧٥ لسنة ١٩٦٧ و ٥٥٤ لسنة ١٩٨٤ في شأن علف الحيوان ومواد العلف الخام (والقرارات الوزارية المعدلة لها) ، فإذا اختلفت صفات الأعلاف عما جاء في هذين القرارين ؛ اعتبرت مادة العلف تالفة أو مغشوشة ، وفيما يلي هذه المواصفات :

أولاً : الحبوب ومنتجاتها :

١ ـ الفول : يجب أن يكون جافاً ، خاليا من السوس والحصى والطين ، ذا رائحة مقبولة، وأن يكون قد مضى عليه شهرا على الأقل بعد الحصاد ، ولا يقل معدل النظافة عن ٩٠ ٪ ولا تزيد نسبة الإصابة بالحشرات عن ١٠ ٪ ، ولا تقل نسبة البروتين الخام عن ٢٢ ٪ .

٢ ـ دق الفول : وهو كسر حبوب الفول الناتجة أثناء جرش الحبوب ، ويجب أن يكون خاليا من الأتربة ، ولاتزيد نسبة القشر عن ١٠ ٪ ، ولا تزيد نسبة الرماد الخام عن ١٢ ٪ ، ولا تزيد نسبة الألياف الخام عن ١٤ ٪ ، ولا تقل نسبة البروتين عن ٢٢ ٪ .

٣ ـ الشعير : يفضل أن يكون لونه أصفر ذهبياً أو أبيض سنجابيا ، ذا رائحة مقبولة ، غليظ الحب ، ثقيل الوزن ، صلباً خالياً من العفونة والطين والحبوب الغريبة والسوس ، ولا يقل معدل النظافة عن ٩٠ ٪ ، ولا تزيد نسبة الإصابة بالحشرات عن ١٠ ٪ ، ولا تقل نسبة الكربوهيدرات الذائبة عن ٧٠ ٪ .

٤ ـ الذرة الشامية والرفيعة : يفضل أن تكون من إنتاج نفس العام ، خالية من الحشرات والطفيليات ، ولا يقل معدل النظافة بها عن ٩٠ ٪ ، ولا تزيد نسبة الإصابة بالحشرات عن ١٠ ٪ ، ولا تقل نسبة الكربوهيدرات الذائبة عن ٧٠ ٪ ، ولا تزيد الرطوبة عن ١٢ ٪ .

٥ ـ سن العدس : وهو كسر حبوب العدس الناتج عند جرش الحبوب ، وتكون مختلطة بالقشور ، ويجب أن تكون خالية من الأتربة والتكتل ، ولا تزيد نسبة القشور عن ١٠ ٪ ، ولا تزيد نسبة الرماد الخام عن ١٠ ٪ ولا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٨ ٪ ، ولا تقل نسبة البروتين الخام عن ٢٢ ٪ .

٦ ـ قشر العدس : وهو القشور الخارجية للحبوب مختلطة ببعض سن العدس ، ويجب أن تكون خالية من الأتربة ، ولا تزيد نسبة الرماد الخام عن ٦ ٪ ، ولا تزيد نسبة الألياف عن

٣٦ ٪ ، ولا تقل نسبة البروتين عن ٦ ٪ .

٧ ـ قشر الفول : القشور الخارجية لحبوب الفول مختلطة ببعض دق الفول ، خالية من الأتربة ، ولا تزيد نسبة الرماد الخام عن ٦ ٪ ، ولا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٤٢ ٪ ، ولاتقل نسبة البروتين الخام عن ٣ ٪ .

٨ ـ نخالة القمح (الردة) : عبارة عن قشور حبوب القمح والناتجة عن النخل بعد الطحن ، ويجب أن تكون خالية من الشوائب والحشرات والتكتل الناشئ عن العفن ، وأن تكون مقبولة الرائحة ، صفراء اللون ، خالية من المواد الناتجة من الإصابة ببعض الفطريات التي تصيب الحبوب ، وينبغي ألا تقل نسبة البروتين الخام عن ١١ ٪ للردة الناعمة ، أو ١٠ ٪ للخشنة ولا تزيد نسبة الألياف الخام عن ١٠ ٪ للناعمة ، و١٣ ٪ للخشنة ، ولا تزيد نسبة الرماد الخام عن ٥ ، ٦,٥ ٪ للناعمة والخشنة على الترتيب .

٩ ـ نخالة الشعير : ناتج نخل حبوب الشعير بعد طحنها ، خالية من الشوائب والحشرات والتكتل الناشئ عن العفن ، مقبولة الرائحة ، صفراء اللون مبيضة ، خالية من السواد الناتج عن إصابة الحبوب ببعض الفطريات ، ولا تقل نسبة البروتين الخام عن ٩ ٪ ، ولا تزيد نسبة الألياف الخام عن ١٤ ٪ .

١٠ ـ نخالة الذرة : ناتج نخل حبوب الذرة الشامية بعد طحنها ، أو متخلفة من استخلاص النشا من الذرة ، ويجب أن تكون خالية من الشوائب والحشرات والفطريات والتزنخ ، وأن تكون مقبولة الرائحة ، ولا تقل نسبة البروتين الخام عن ٩ ٪ ، ولا تقل نسبة الكربوهيدرات الذائبة عن ٦٠ ٪ ولا تزيد نسبة الألياف الخام عن ١٢ ٪ .

١١ ـ رجيع الأرز : ناتج ضرب الأرز الشعير ، ويجب أن يكون خاليًا من قشور الحبوب الخارجية (السرس) والملح والجبس والحشرات والتكتل والعفن والتزنخ ، وأن يكون مقبول الرائحة ، لونه أبيض مصفر (سمني غامق) ، ويجب أن يكون ناتجًا عن ضرب محصول أرز نفس العام ، ولا تقل نسبة البروتين الخام عن ١٢ ٪ ، ولا تقل نسبة الكربوهيدرات الذائبة عن ٤٢ ٪ ، ولا تزيد نسبة الرماد الخام عن ١٢ ٪ ولا تزيد نسبة الألياف الخام عن ١١ ٪ ، ولا تزيد نسبة الرطوبة عن ١٢ ٪ ، ولا تقل نسبة الزيت عن ١١ ٪ وبالنسبة لرجيع الأرز المستخلص لا تقل نسبة البروتين الخام عن ١٣ ٪ ، والكربوهيدرات الذائبة عن ٤٥ ٪ ، ولا تزيد نسبة الرماد الخام عن ١٣,٥ ٪ والألياف الخام عن ١٢,٥ ٪ والرطوبة عن ١٣ ٪ والزيت عن ٢ ٪ .

١٢ ـ جرمة الأرز : وهي جنين حبوب الأرز مختلطة بكسر الأرز ، ويجب أن تكون مقبولة الرائحة ، خالية من قشور الحبوب الخارجية والشوائب والعفن والتزنخ ، ولونها ثابت غير متغير أي أبيض مصفر (سمني غامق) ، ويشترط ألا تقل نسبة البروتين الخام عن ١٨ ٪ ،

ولا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٨ ٪ ، وألا تزيد نسبة الدهن الخام عن ٦ ٪ .

١٣ ـ جلوتين الذرة : متخلف عن صناعة النشا بعد استخلاص معظم النشا والجنين واستبعاد النخالة (قشور خارجية) ، ويجب أن يكون خالياً من التعفن والتكتل والحشرات، ومن آثار الحامض أو الصودا الكاوية ، ومقبول الطعم والرائحة ، ويشترط ألا تقل نسبة البروتين الخام عن ٣٤ ٪ ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٦ ٪ .

١٤ ـ مخلفات نشا الذرة : وهي المتخلف من الذرة بعد استبعاد معظم النشا والجلوتين والجنين ، ويجب أن يكون خالياً من التعفن والحشرات والمواد الغريبة ، ومن آثار الحامض والصودا الكاوية ، مقبول الطعم والرائحة ، ولونه سمني غامق ، ويشترط ألا تقل نسبة البروتين الخام عن ١٨ ٪ ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ١٠ ٪ ، وألا تزيد نسبة الرطوبة عن ١٢ ٪ .

١٥ ـ كسب جنين الذرة : ناتج عصر جنين الذرة ، على هيئة ألواح أو مجروش أو مسحوق، ويكون لونه سمنياً فاقعاً ، حسن الطعم والرائحة ، خالياً من التعفن والحشرات والمواد الغريبة كالمسامير وقطع الحديد ، ومن آثار الحامض أو الصودا الكاوية ، ويشترط ألا تزيد نسبة الرماد الخام عن ٤ ٪ ، وألا تقل نسبة البروتين الخام عن ١٨ ٪ ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ١٠ ٪ .

١٦ ـ مخلفات نشا الأرز : ناتج صناعة النشا ، ويجب أن يكون خالياً من الشوائب والحشرات والعفن والتزنخ والتكتل ، مقبول الطعم والرائحة ، ذا لون سمني فاتح ، بشرط ألا تقل نسبة البروتين الخام عن ٨ ٪ ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٤ ٪ ، وألا تزيد نسبة الرماد الخام عن ٣ ٪ .

ثانياً : مخلفات البذور الزيتية :

١ ـ كسب بذرة قطن غير مقشور : ناتج عصر بذرة القطن بالضغط الهيدروليكي ، أو بالاستخلاص بالمذيبات العضوية ، ويجب أن يكون مقبول الطعم والرائحة ، خالياً من العفن والحشرات والزغب والمسامير وقطع الحديد ، وأن يكون لونه بنياً مخضراً متماسك غير محروق ، ويشترط ألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٢٣ ٪ ، وألا تزيد نسبة الزيت عن ٦ ٪ ، وألا تقل نسبة البروتين الخام عن ٢٢,٥ ٪ ، وألا تزيد نسبة الرماد الخام عن ٦ ٪ ، وذلك للناتج بطريقة الضغط الهيدروليكي ، أما الناتج بطريقة الاستخلاص بالمذيبات فلا تزيد نسبة الزيت عن ١ ٪ وألا تزيد نسبة الجوسيبول عن ٠,٠٧ ٪ والألياف الخام عن ٢٤,٥ ٪ ، إضافة لنفس باقي المواصفات للغير مستخلص .

٢ ـ كسب بذرة قطن مقشورة : ناتج العصر للبذور بالضغط الهيدروليكي أو بالاستخلاص بالمذيبات العضوية ، خال من قشور البذرة ، ومن التكتل والتعفن والحشرات والمواد الغريبة ،

ولونه أصفر ذهبي ، ويشترط ألا تزيد نسبة الرمال والمواد الغريبة عن ١ ٪ ، وألا تقل نسبة البروتين الخام عن ٤٠ ٪ ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ١٠ ٪ ، وألا تزيد نسبة الزيت عن ٦ ٪ في كسب الضغط الهيدروليكي ، وعن ٢ ٪ في كسب الاستخلاص بالمذيبات العضوية ، وألا تزيد نسبة الجوسيبول عن ٠,٠٩ ٪ والرماد الخام عن ٧٪ .

٣ ـ كسب بذر الكتان : ناتج عصر بذور الكتان ، ويجب أن يكون خاليًا من التعفن والحشرات والمواد الغريبة ، لونه رماديًا ضاربًا إلى الحمرة (بنفسجي) ، وأقراصه صلبة صعبة الكسر ، وبالأقراص قشور لامعة وهي قصرات البذور ، وأن يكون مقبول الرائحة والطعم ، ويشترط ألا تقل نسبة البروتين الخام عن ٢٩ ٪ ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٩ ٪ ، وألا تزيد نسبة الزيت الخام عن ٧ ٪ ، وألا تزيد نسبة المواد الغريبة عن ٧ ٪ .

٤ ـ كسب بذرة السمسم : يجب أن يكون خاليًا من التعفن والحشرات والمواد الغريبة ، مقبول الطعم والرائحة ، لونه رمادي صافي للسمسم الأبيض ، أو أحمر غير معتم للسمسم البني ، ويشترط ألا تقل نسبة البروتين الخام عن ٣٦ ٪ ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٦ ٪ ، وألا تزيد نسبة الزيت الخام عن ١٠ ٪ .

٥ ـ كسب الفول السوداني : يجب أن تكون خالياً من التعفن والحشرات والمواد الغريبة خصوصاً الرمال ، وأن يكون حلو المذاق مقبول الرائحة ، لونه أبيض أو أبيض رمادي، ويجب ألا تقل نسبة البروتين الخام عن ٤٢ ٪ للمقشور ، ٣٢٪ لغير المقشور ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٨٪ للمقشور ، ٢٤ ٪ لغير المقشور .

ثالثًا : مواد العلف الخضراء :

١ ـ البرسيم : يجب أن يكون ناتجًا عن حشات خالية من الجذور والماء والنباتات الغريبة والحشائش ، ويجب أن يكون محشوشاً في نفس اليوم المورد فيه ، ويشترط ألا تزيد نسبة الرطوبة عن ٩٠ ٪ لبرسيم الحشة الأولى ، وعن ٨٨ ٪ لبرسيم الحشة الثانية ، و٨٥٪ لبرسيم باقي الحشات .

٢ ـ الدراوة : نباتات الذرة الشامية عمر ١,٥-٢ شهر ، وأخذت ريتين على الأقل ، لونها أخضر مصفراً ، ويجب ألا تكون الأوراق السفلى ذابلة ، كما يجب أن تكون خالية من الحشائش الضارة بالحيوانات ، وأن تكون مقطوعة في نفس اليوم ، خالية من الماء أو التعفن والتخمر ، وألا تزيد نسبة الرطوبة عن ٨٥٪ .

٣ ـ مواد علف خضراء أخرى : حشيشة السودان والذرة السكرية والريانة وغيرها ، ويجب أن تكون خالية من الحشائش الضارة بالحيوانات ، وألا تقل عمرها عن ٤٥ يوماً ، وأن

تكون مقطوعة في نفس اليوم ، وخالية من الماء والعفن وبشرط ألا تزيد نسبة الرطوبة بها عن ٨٥٪ .

رابعًا : مواد العلف الخشنة :

١ ـ **الأتبـان** : تشمل تبن القمح والشعير والبرسيم والفول ، ويجب أن تكون ناتجة من محصول نفس العام ، وأن يكون طول قطعها ٣ ـ ٥ سم ، كما يجب أن يكون التبن نظيفًا خاليًا من التعفن والقصلة والأتربة ، وبشرط ألا تزيد نسبة الرطوبة عن ١٠ ٪ ، وألا تزيد نسبة المواد الغريبة عن ٤ ٪ .

٢ ـ **دريس البرسيم** : ناتج الحشات ٢-٤ للبرسيم من محصول نفس العام ، ويجب أن يكون لونه أخضر ومحتويًا على الأوراق الكاملة والسيقان ، تام الجفاف ، مقبول الرائحة ، خاليًا من العفن والطين والحشائش التي تنمو في البرسيم ، ويشترط ألا تزيد نسبة النباتات المزهرة (النوارة) عن ٥ ٪ ، وألا تقل نسبة البروتين الخام عن ١١ ٪ وألا تزيد نسبة الرطوبة عن ١٢ ٪ .

خامسًا : مواد علف نباتية أخرى :

١ ـ **السيلاج** : يمتاز السيلاج الجيد بلونه ورائحته المقبولين ، وقوامه الجيد ، وألا تزيد نسبة الأمونيا عن ٨ ٪ ، مع ضآلة حمض الخليك ، وانعدام حمض البيوتريك .

٢ ـ **المولاس** : ناتج صناعة السكر من القصب ، ثخين القوام ، لونه بني محروق غير متخمر ، من عصير محصول قصب السكر لنفس العام ، ويشترط ألا تزيد نسبة الرطوبة عن ٢٥ ٪ ، والرماد عن ١٢ ٪ ، وألا تقل نسبة السكر عن ٤٨ ٪ كسكر محول ، ومحلوله المخفف بوزن مساو من الماء لا يقل عن ٣٩,٧٥ درجة بركس .

سادسًا : مواد العلف الحيوانية :

١ ـ **مسحوق دم مجفف** : خال من اللحم والدهن وباقي أجزاء الحيوان الأخرى ، معقم خال من العفن والتزنخ ، بشرط ألا تقل نسبة البروتين الخام عن ٨٠ ٪ ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ٢ ٪ ، وألا تزيد نسبة الدهن الخام عن ١ ٪ .

٢ ـ **مسحوق اللحم المجفف** : خالي من الشعر والحوافر والقرون والدم ومحتويات المعدة والأمعاء والعظام ، معقم خال من العفن والتزنخ ، لا تقل نسبة البروتين الخام عن ٥٥ ٪ ، ولا تزيد نسبة الدهن الخام عن ١٠ ٪ ، وألا تزيد نسبة الرماد عن ٦ ٪ .

٣ **مسحوق السمك المجفف** : معقم خال العفن ، ولا تقل نسبة البروتين الخام فيه عن ٦٠ ٪ ، ولا تزيد نسبة الرماد عن ١٥ ٪ ، ولا تزيد نسبة ملح الطعام عن ٤ ٪ ، وألا تزيد نسبة الألياف الخام عن ١ ٪ .

٤ ـ **مسحوق العظام** : خالي العفن والتزنخ والرمال والأتربة ، ولا تقل نسبة الكالسيوم به عن ٢٨ ٪ ، والفوسفور عن ١٤ ٪ ، وألا تزيد نسبة الدهن الخام عن ١ ٪ ، وألا تزيد نسبة الرطوبة عن ١٠ ٪ ، ومسحول الأصداف البحرية خالي الرماد والأتربة ولا يقل فيه الكالسيوم عن ٣٥ ٪ .

٥ ـ **زيت كبد الحوت** : زيتي القوام ، له طعم ورائحة السمك ، خال من التزنخ ، ويشترط ألا تقل محتوياته عن ٨٥٠ وحدة دولية من فيتامين أ / جم ، وألا تقل محتوياته عن ٦٥ وحدة دولية من فيتامين د / جم ، وألا تقل كثافته عن ٠,٩١٨ ولا تزيد عن ٠,٩٢٧ .

سابعًا : مواد معدنية :

١ ـ **ملح الطعام** : يجب ألا تقل درجة نقاوته عن ٩٥ ٪ .

ثامنًا : العلف المصنع :

نوع العلف	بروتين خام ٪ لا يقل عن	دهن خام ٪ لا يقل عن	ألياف خام ٪ لا تزيد عن
علف أغنام	١٤	٢	١٩
علف خيول	٩	٢	١٩
علف جمال	١٦	٢	١٩
علف مواشي لبن	١٦	٢	١٩
علف عجول	١٧	٢,٥	١٨
علف ثيران	١٦	٢	١٨
علف تسمين بداري	١٧	٢,٥	٥,٥
علف كتاكيت حتى ٨ أسابيع	٢٠	٢,٥	٥,٥
علف دجاج بياض	١٨	٢,٥	٧
علف دجاج رومي كتاكيت	٢٢	٢,٥	٧
علف دجاج رومي نمو	١٨	٢,٥	٧
علف دجاج رومي للبيض	٢٢	٢,٥	٨

ثانيًا : الماء

وضعت الولايات المتحدة (خدم الصحة العامة) مواصفات لماء الشرب تضمنت :

ـ الخصائص الطبيعية : العكارة : لا تزيد عن ١٠ جزء / مليون (مقياس سليكا) .

اللون : لا يزيد عن ٢٠ جزء / مليون (مقياس كوبلت) . الطعم : خال من أي رائحة أو طعم مرفوضين .

ـ الخصائص الكيماوية : بالنسبة للعسر تنقسم المياه إلى :

ماء يسر Soft يحتوي على أقل من ٥٠ جزء / مليون كربونات كالسيوم .

ماء قليل العسر يحتوي على ٥٠–١٠٠ جزء / مليون كربونات كالسيوم .

ماء عسر Hard يحتوي على ١٠٠–٢٠٠ جزء / مليون كربونات كالسيوم .

ماء عسر جداً يحتوي على أكثر من ٢٠٠ جزء / مليون كربونات كالسيوم .

وبالنسبة للأملاح الأخرى فإن ماء الشرب القياسي يجب أن يحتوي :

	الحد الأقصى المقترح مجم / لتر	الحد المرفوض مجم / لتر
منظف (الكيل بنزين سلفونات)	٠,٥٠	—
زرنيخ	٠,٠١	٠,٠٥
باريوم	—	١,٠٠
كادميوم	—	٠,٠١
كربون (مستخلص كلوروفورم)	٠,٢٠	—
كلوريد	٢٥٠,٠٠	—
كروميوم	—	٠,٠٥
نحاس	١,٠٠	—
سيانيد	٠,٠١	٠,٢٠
فلوريد	١,٧٠	٢,٢٠
حديد	٠,٣٠	—
رصاص	—	٠,٠٥
منجنيز	٠,٠٥	—

	الحد الأقصى المقترح مجم / لتر	الحد المرفوض مجم / لتر
نيترات	٤٥,٠٠	—
فينولات	٠,٠٠١	—
سلنيوم	—	٠,٠١

ـ **أما الخصائص الميكروبيولوجية** : فتتحدد صلاحية الماء للشرب من عدمه على أساس غياب مجموعة بكتيريا الكوليفورم التي تشمل الأشريشيا والأيروباكتر كمؤشر للتلوث بالبراز.

وللحفاظ على ماء النيل من التلوث فقد وضع قانون رقم ٤٨ لسنة ١٩٨٢ ، وصدر قرار وزير الري رقم ٨ لسنة ١٩٨٣ بلائحة تنفيذية لهذا القانون ، وذلك لتحديد مواصفات مسطحات المياه العذبة على النحو التالي :

البيـــان	المعايير والمواصفات مجم / لتر مالم يذكر غير ذلك
اللون	لايزيد عن ١٠٠ درجة
مجموع المواد الصلبة	٥٠٠
درجة الحرارة	٥° م فوق المعتاد
الأوكسچين الذائب	لا يقل عن ٥
الأس الهيدروچيني	٧ – ٨,٥
الأوكسچين الحيوي الممتص	لا يزيد عن ٦
الأوكسچين الكيماوي المستهلك	لا يزيد عن ١٠
نيتروچين عضوي	لا يزيد عن ١
نشادر	لا يزيد عن ٠,٥
شحوم وزيوت	لا يزيد عن ٠,١
القلوية الكلية	لا يزيد عن ١٥٠ ولا تقل عن ٢٠
كبريتات	لا يزيد عن ٢٠٠
مركبات زئبق	لا يزيد عن ٠,٠٠١
حديد	لا يزيد عن ١
منجنيز	لا يزيد عن ٠,٥

البيـــان	المعايير والمواصفات مجم / لتر مالم يذكر غير ذلك
نحاس	لا يزيد عن ١
زنك	لا يزيد عن ١
منظفات صناعية	لا تزيد عن ٠,٥
نترات	لا تزيد عن ٤٥
فلوريدات	لا تزيد عن ٠,٥
فينول	لا تزيد عن ٠,٠٢
زرنيخ	لا تزيد عن ٠,٠٥
كادميوم	لا تزيد عن ٠,٠١
كروم	لا تزيد عن ٠,٠٥
سيانور	لا تزيد عن ٠,١
رصاص	لا تزيد عن ٠,٠٥
سلنيوم	لا تزيد عن ٠,٠١

كما نص نفس القانون والقرار على معايير المخلفات الصناعية السائلة المعالجة المصرح بصرفها إلى الماء العذب كما وصفتها وزارة الصحة (مجم / لتر) على النحو التالي :

البيـــان	الحـــد الأقصـــى للصـــرف على	
	نهر النيل	رياحات وترع وخزانات جوفية
درجة الحرارة	٣٥° م	٣٥° م
الأس الهيدروچيني	٦ – ٩,٩	٦ – ٩
اللون	خاليـة مـن المـواد الملونـة	
الاوكسجين الحيوي الممتص	٣٠	٢٠
الأوكسجين المستهلك (دايكرومات)	٤٠	٣٠
الأوكسجين المستهلك كيماويا (برمنجنات)	١٥	١٠
مجموع المواد الصلبة الذائبة	١٢٠٠	٨٠٠
رماد المواد الصلبة الذائبة	١١٠٠	٧٠٠
المواد العالقة	٢٠	٢٠
الكبريتيدات	١	١
الزيوت والشحوم والراتنجات	٥	٥

البيـــان	الحـــد الأقصـــى للصـــرف على	
	نهر النيل	رياحات وترع وخزانات جوفية
الفوسفات (غير العضوي)	١	١
النترات	٣٠	٣٠
الفينولات	٠,٠٠٢	٠,٠٠١
الفلوريدات	٠,٥	٠,٥
الكلور المتبقي	١	١
زئبق	٠,٠٠١	٠,٠٠١
رصاص	٠,٠٥	٠,٠٥
كادميوم	٠,٠١	٠,٠١
زرنيخ	٠,٠٥	٠,٠٥
كروم	٠,٠٥	٠,٠٥
نحاس	١	١
نيكل	٠,١	٠,١
حديد	١	١
منجنيز	٠,٥	٥,٥
زنك	١	١
فضة	٠,٠٥	٠,٠٥
منظفات صناعية	٠,٠٥	٠,٠٥
العدد البكتيري للمجموعة القولونية في ١٠٠سم^{3}	٢٥٠٠	٢٥٠٠

ومياه المصارف قبل رفعها إلى مسطحات المياه العذبة يجب أن تتوفر فيها المعايير التالية :

البيـــان	المعايير (مجم / لتر)
اللون	لايزيد عن ١٠٠ وحدة
مجموع المواد الصلبة	٥٠٠
درجة الحرارة	٥° م فوق المعتاد
الرائحة	٢ درجة على البارد
الأوكسجين الذائب	لا يقل عن ٥

البيـــــان	المعايير (مجم / لتر)
الأوكسچين الهيدروچيني	٧ – ٨,٥
الأوكسچين الحيوي الممتص	لايزيد عن ١٠
الأوكسچين الكيماوي المستهلك (دايكرومات)	لا يزيد عن ١٥
الأوكسچين الكيماوي المستهلك (برمنجنات)	لا يزيد عن ٦
نشـــادر	لا يزيد عن ٠,٥
زيوت وشحـوم	لا يزيد عن ١
قلوية كلية	٥٠ – ٢٠٠
زئبق	لا يزيد عن ٠,٠٠١
حـديد	لا يزيد عن ١
منجنيز	لا يزيد عن ١,٥
نحاس	لا يزيد عن ١
زنك	لا يزيد عن ١
منظفات صناعية	لا يزيد عن ٠,٥
نترات	لا يزيد عن ٤٥
فلوريدات	لا يزيد عن ٠,٥
فينول	لا يزيد عن ٠,٠٢
زرنيخ	لا يزيد عن ٠,٠٥
كادميوم	لا يزيد عن ٠,٠١
كروم	لا يزيد عن ٠,٠١
سيانيد	لا يزيد عن ٠,١
تانين ولجنين	٠,٥
فوسفات	١
كربون (مستخلص كلوروفورم)	١,٥ جم / لتر
عد بكتريا القولون / ١٠٠ سم٣	٥٠٠٠

ويجب أن تبقى مسطحات الماء غير العذب بعد الصرف إليها في حدود المعايير التالية :

البيـــان	المعايير
درجة الحرارة	لاتزيد عن ٥ درجات فوق المعتاد
الأوكسچين الذائب	لا يقل عن ٤ مجم / لتر
الأس الهيدروچيني	٧ – ٨,٥
المنظفات الصناعية	لا تزيد عن ٠,٥ مجم / لتر
الفينول	لا يزيد عن ٠,٠٠٥ مجم / لتر
العكارة	لا تزيد عن ٥٠ وحده
المواد الصلبة الذائبة	لا تزيد عن ٦٥٠ مجم / لتر
عد بكتريا القولون / ١٠٠سم٣	لا تزيد عن ٥٠٠٠

وفي حالة صرف المخلفات السائلة إلى البحيرات فيجب ألا يزيد عد بكتريا القولون في مصايد الأسماك بالبحيرة عن ٧٠ / ١٠٠سم٣ ، ولا تزيد عن ٢٣٠ / ١٠٠سم٣ في ١٠٪ من العينات المأخوذة من ماء البحيرة في مواسم الصيد .

وأقصى حد مسموح به من العناصر الثقيلة في الماء بالميكروجرام / لتر هي ٥٠–٥٠٠٠ للرصاص ، ٥ للزئبق ، ٥ – ٥٠ للكادميوم .

ثالثًا : المنتجات الحيوانية

وتخضع لقانون رقم ١٠ لسنة ١٩٦٦ (بشأن مراقبة الأغذية وتنظيم تداولها وفحصها) والمعدل بقانون رقم ٣٠ لسنة ١٩٧٦ ، وبقرار وزير الصحة رقم ٥٣٠ لسنة ١٩٧٩ ، والقانون رقم ١٠٦ لسنة ١٩٨٠ وقرار وزير الصحة رقم ٧٨٢ لسنة ١٩٨٤ ، وقرار رئيس مجلس الوزراء رقم ٢٩١ لسنة ١٩٨٦ ، وقرار وزير الصحة رقم ٣٠٢ لسنة ١٩٨٦ ، بجانب القانون رقم ١٣٢ لسنة ١٩٥٠ ، والقرارات المعدلة له لوزيرالصحة في ١٩٥٢/٦/٢١ ، ورقم ٤٨٨ لسنة ١٩٧٨ .

والحد الأقصى المسموح به من العناصر الثقيلة في الغذاء بالميكروجرام / كجم هي ٢٠٠ للرصاص ، ٥٠٠ للزئبق ، ١٣٥ للكادميوم . بينما التحليل الكيماوى للمنتجات الحيوانية فعلى النحو التالى:

المنتج	ماء ٪	بروتين ٪	دهن ٪	رماد ٪
لبن ماشية	٨٧	٣,٦	٣,٧	٠,٧
لبن أغنام	٨١	٦,٥	٦,٩	٠,٩
لبن ماعز	٨٦	٤,٣	٤,٨	٠,٨
لبن جاموس	٨١	٦,١	٧,٥	٠,٩
لحوم ماشية	٦٢	١٧,٥	١٥,٥	٠,٩
لحوم عجول	٧٢	١٧	٩	١,٠
لحوم أغنام	٥٨	١٣,٥	٢٢,٥	١,٠
لحوم دجاج	٥٦	١٨	٢٥	١,٠
لحوم بط	٥٤	١٦	٢٨	١,٠
لحوم أرانب	٦٨	٢٢	٤,٥	٢,١
ثعبان سمك		١٥	٢٤,٥	
سمك مبروك		١٨	٤,٨	
سمك قرموط		١٥,٨	٢,٨	
سمك ماكريل		١٨,٨	١١,٦	
بياض بيض دجاج	٨٥	١٠,٣	٠,٠٣	٠,٧
صفار بيض دجاج	٤٧	١٦,٨	٣٠,٦	١,٨
بياض + صفار	٧٣	١٢,٧	١١,٣	١,٠

رابعًا : الروث

يختلف تركيب الروث باختلاف الحيوان واختلاف الغذاء فتختلف قيمته بالتالي :

تحليل زرق الدواجن من مختلف الأنواع كنسب مئوية :

النـــوع	الرطوبة	النيتروچين	خامس أوكسيد الفوسفور	أوكسيد بوتاسيوم
كتاكيت (بطاريات)	٧٣	١,٥	١,١	٠,٦
كتاكيت (فرشة)	٢٨	٢,٤	٢,٢	١,٤
بط (فرشة قش)	٣٢-٦٠	٠,٨-٣,٢	١,٤ ـ ٢,٣	٠,٦-٢,٢
	٦	٠,٤	١,٠	٠,٦
أوز (طازج)	٧٥	٠,٦	٠,٦	٠,٨

مقارنة التركيب الكيماوي لروث البقر بزرق الدجاج:

التركيب الكيماوي ٪	روث بقـر	زرق دجاج
مادة جافة	٢٠,٠٠	٥٦,٠٠
مادة عضوية	١٨,٠٠	٢٥,٥٠
نيتروچين	٠,٣٠	١,٦٠
فوسفور	٠,١٠	٠,٧٠
كالسيوم	٠,٠٧	١,٧٠
بوتاسيوم	٠,١٠	٠,٧٠

خامسًا : الــدم

يختلف تركيب دم الحيوانات المختلفة كما يظهره الجدولان الآتيان :

التركيب الطبيعي لدم الحيوانات الزراعية :

المكونات	ماشية	أغنام	ماعـز	خيول	أرانب	دجاج
عدد كرات الدم الحمراء بالمليون / م^{3}	٦,٣	١٠,٥	١٤,٣	٦,٥	٦,٠	٣,٥
عدد كرات الدم البيضاء بالألف / م^{3}	٧,٥	٨,٥	—	٧,٥	٩,٠	٢٩,٠٠
هيماتوكريت ٪ حجم	٣٥	٣٥	٣٢	٣٦		
هيموجلوبين جم ٪	١١,٥	١٢,٢	١٠,٧	١٢	١٢,٥	١٣,١
جلوكوز مجم ٪	٤٠–٧٠	٤٠–٥٠	٤٥	٥٥–٩٠	١٠٠	١٣٠–١٦٠
كوليسترول مجم ٪	١٤٠	٧٥	١٠٥	١٤٣		
نيتروجين كلي جم ٪	١,٣	٠,٩	١,٠	١,١		
يوريا مجم ٪	٢٠–٤٠	١٢,٥	١٢,٥	٢٠–٤٠		
كالسيوم مجم ٪	١١	١٠,٥	١٠,٠	١٢,٠		
فوسفور مجم ٪	٥,٨	٥,١	٦,٨	٣,٥		
ماغنسيوم مجم ٪	٢,٥	٣,٠	٣,١	٣,٣		
قيمة الـ PH	٧,٥	٧,٤٩	٧,٥	٧,٤	٧,٦	
بيليروبين مجم ٪	٨,٦			١٢–٥٣	أقل من ١٧,١	

تركيب دم لفئران الكبيرة (الجرذان Rats)

التركيب	التركيز
قيمة Ph	٧,٤ – ٧,٥
هيموجلوبين	٨,٧٧ ملي مول / لتر (١٤,١٥ جم / ١٠٠ مل)
عدد كرات الدم الحمراء	٨,٧٣ مليون / م٣
عدد كرات الدم البيضاء	١٥٦٥٠ / م٣
جلوكوز (صايم)	٤,٢٧ ملي مول/لتر (٧٦,٨٨ مجم/١٠٠ مل)
صوديوم	١٣٤,٠٣ ملي مكافئ/لتر
بوتاسيوم	٢,٥٣ ملي مكافئ/لتر
كالسيوم	٤,٢٢ ملي مكافئ/لتر
ماغنسيوم	١,٠٤ ملي مول/لتر
حديد	٢٤,١٩ ميكرو مول/لتر
كلور	١٢١,٨٨ ملي مول/لتر
ألفا إميلاز	٢٢٤١,٠٢ وحده/لتر
بيليروبين كلي	٥,٩٩ ميكرو مول/لتر
كوليسترول	٢,٧٣ ملي مول/لتر
كولين إستراز	٠,٢٢ كيلو وحدة/لتر
بروتين كلي	٦٧,٢ جم/لتر
يوريا	٨,٤٣ ملي مول/لتر
أزوت يوريا	٣,٩٤ ملي مول/لتر
كرياتينين	٥٨,٣٤ ميكرو مول/لتر
فوسفات غير عضوي	٢,٤٩ ملي مول/لتر
فوسفاتاز قاعدي	١٢٢,٢٢ وحدة/لتر
فوسفاتاز حامضي	٢٥,٢٦ وحدة/لتر
جلوتامات أوكسالواسيتات	٣٢,٥٨ وحدة/لتر
جلوتامات بيروفات	٢٦,٢٠ وحدة/لتر

سادسًا : السائل المنوي

يختلف تركيب السائل المنوي كما يوضحه الجدولان التاليان :

حجم السائل المنوي وتركيز الحيوانات المنوية :

نوع الحيوان	حجم السائل المنوي (مل)	تركيز الحيوانات المنوية (بالألف/م٣)	عدد الحيوانات المنوية في القذفة (بالبليون)
حصان	٧٠ – ١٠٠	١٠٠	٧,٠ – ١٠,٠
ثـــور	٣ – ٥	١٠٠٠	٣,٠ – ٥,٠
كبـش	٠,٨ – ٢,٠	١٠٠٠	٠,٨ – ١,٠
أرنب	٠,٢ – ٢,٥	٦٠٠	٠,٦ – ١,٠
ديك	٠,٦ – ١,٥	٣٠٠٠	١,٧ – ٢,٤

التحليل الكيماوي للسائل المنوي (مجم / ١٠٠ مل) :

التركـيب	ثـــور	كبـــش
مادة جافة	٩,٥٣٠	١٤,٨٢٠
كلوريدات	٣٧١	٨٧
صوديوم	١٠٩	١٠٣
بوتاسيوم	١٨٨	٧١
كالسيوم	٣٤	٩
ماغنسيوم	١٢	٣
فسفور كلي	٨٢	٣٥٧
فسفور غير عضوي	٩	١٢
نيتروجين كلي	٧٥٦	٨٧٥
نيتروجين غير بروتيني	٤٨	٥٧
يوريا	٤	٤٤
فركتوز	٥٤٠	٢٤٧
حامض لاكتيك	٢٩	٣٦
حامض سيتريك	٧٢٠	١٣٧

مراجع هذا الفصل هى :

– الجريدة الرسمية – عدد ٢٥ مكرر صادرة فى ٢٦ / ٦ / ١٩٨٢ .

– الوقائع المصرية – عدد ٣١ صادر فى ٥ / ٢ / ١٩٨٣ .

– مجموعة التشريعات الزراعية بشأن علف الحيوان (الجزء الثانى) : الهيئة العامة لشؤون المطابع الأميرية (١٩٨٨) .

– مجموعة التشريعات الصحية الخاصة بمراقبة الأغذية والألبان والمواد الملونة والحافظة (الجزء الثانى) : الهيئة العامة لشؤون المطابع الأميرية (١٩٩٢) .

– محمد جمال الدين قمر (وآخرون)– أسياسيات فسيولوچيا الإنتاج الحيوانى – مطبعة التقدم – القاهرة (١٩٨٥) .

- Close , W. & Menke , K, . H. (1986) Selected topics in animal nutrition . Deutsche stiftung fur internationale . Entwicklung , Feldafing, Germany .

- Kust , D. et al. (1954) Die Besamung beim Rind . Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart .

- Loeweneck, H. et al. (1974) Laborwerte der Wistar - Ratte . Anat . Inst . der Univ . Munchen .

- Merck, E. (1976) Labordiagnostik in der Tiermedizin . Merck , Darjmstadt .

- Ranganna , S. (1979) Manual of analysis of fruit and vegtable products . Tata Mc Graw - Hill , New Delhi .

- Soliman, M . K & Abd El Moty , I . (1976) A modern approach to veterinary clinical & laboratory diagnosis . The Scientific Book Centre , Cairo .

الباب الثاني
التحليل النباتي والنوعي والحسي

الفصل الأول

مواد العلف

تتكون مواد العلف من خلايا ، وتتركب هذه الخلايا من عناصر أساسية ، وهي الكربون والهيدروچين والأوكسچين والنتروچين ، كما تحتوي على كميات بسيطة من الأنيونات والكاتيونات ، مثل الكبريت والكلور والفوسفور والصوديوم والبوتاسيوم ... إلخ . والجزء الأكبر من المادة الجافة للبروتوبلازم يحتوي على كثير من المركبات العضوية ، أغلبها كربوهيدرات وبروتينات وليبيدات ، وما ينسب إلى هذه المركبات من ڤيتامينات وإنزيمات وهرمونات وغيرها .

ويتم تقييم مواد العلف وتحليلها لهذه المكونات إما وصفياً أو كمياً . ويجرى كذلك التقييم لمواد العلف تقييماً طبيعياً أو بيولوچياً أو ميكروبيولوچيا أو كيماوياً ، وذلك طبقاً لنوع مادة العلف ، وحالتها ، وما يراد تقييمه أو تحليلها من أجله .

ويشمل التقييم أو التحليل الطبيعي أو الحسي على فحص اللون والرائحة والمظهر ورقم الحموضة والقوام وسهولة الكسر وفحص ميكروسكوبي . فعلى سبيل المثال لون السيلاج والأكساب والدريس والحبوب وخلافها ، كل له لون مميز ، ويختلف هذا اللون بقدم المحصول ، أو إطالة فترة تخزينه ، أو سوء ظروف التخزين ، أو بالإصابة بالحشرات أو بالفطريات أو بالبكتريا . واختلاف اللون عن اللون الطبيعي يدل دلالة واضحة على التغيير المحتمل حدوثه في مادة العلف نتيجة الاحتراق الذاتي وهدم المكونات الغذائية ، فالسيلاج الطبيعي لونه بني بورق باهت ، فإذا ظهر بلون أخضر داكن حتى اسمر مع أوراق ممزقه غامقة ، دل ذلك على بداية هدم البروتينات والسليلوز ، هدم مسطحات الوريقات تؤدي للون الداكن ؛ لكن غالباً ما يكون السيلاج غامقاً بتعريضه للهواء .

كما أن لرقم الحموضة أهمية قصوى لبعض مواد العلف كالسيلاج ، فلو زاد رقم PH للسيلاج عن ٥ تكون الجودة مشكوكاً فيها ، وإذا زاد عن ٦ أصبح السيلاج غير صالح للاستهلاك ، وهنا يكون الفقد في الطاقة كبيراً والميكروفلورا تغيرت بحيث تضر بفلورا الكرش ، فتؤدي لاضطراب الكرش .

الرائحة من المقاييس الطبيعية للحكم على جودة مادة علف ، وتميز النموات الفطرية أو البكتيرية ، وبالتالي تدلل على التلف الحادث في العلف . رائحة السيلاج ، مثلاً ينبغي أن تكون عطرية Aromatic ، وإن حدث تخمر خطأ ، تتغير الرائحة كذلك وتصبح مقرفة لوجود حمض البيوتريك أو الأمونيا ، وللتعرف على جودة الرائحة تتطلب مران وتدريب وخبرة حتى يمكن تمييز التعفن من الأكسدة من الحموضة .

ومن الاختبارات الطبيعية كذلك درجة حرارة مادة العلف ، فتدلك على التلف الحادث نتيجة التنفس أو العمليات الميكروبية ، فالسيلاج الأمثل درجة حرارته ١٦-٢٤° م ، إلا أنها تصل إلى ٣٥-٤٠°م أو أكثر في حالة إذا ما كانت العمليات الميكروبية ليست طبيعية في السيلو Silo .

كما أن قوام ومظهر مادة العلف يعطي فكرة لحد ما عن جودتها ، فمثلاً زيادة النفوق قد تدلل على تلف العلف بالحشرات أو الكائنات الحية ، أو نتيجة انفصال المكونات كبيرة الجزيئات نتيجة عدم التجانس في الطحن . كما أن سهولة كسر الأكساب يدلل على غشها أو تلفها وتحللها . تكتل مواد العلف دلالة على تعفنها ، أو إصابتها بالرطوبة أو فقدها قيمتها الغذائية ولو جزئياً . بلل الدريس أو القش يؤدي لعفنه أو إصابته بالبكتريا ، وهكذا يلعب القوام والمظهر لمواد العلف دوراً كبيراً في الحكم على مواد العلف.

أما الفحص الميكروسكوبي فيدلل على الغش في مواد العلف أو المعاملة بعض المواد الضارة ، والذي يؤكده الفحص تحت الأشعة فوق البنفسجية فغش مواد العلف تجارياً يجرى باستخدام مواد مماثلة ، متوفرة بكثرة ، ورخيصة جداً . وتستعمل للغش قشور بذور القطن (قشور خشبية خضراء مسمرة ، توجد في كثير من مواد العلف التي تتبعها ، ويختبر كسب القطن لمعرفة إذا ما كان يحتوي على كثير من القشور أم لا) ، وأغلفة الفول السوداني المطحونة ، وقشور الأرز الصفراء أي الأغلفة الخارجية للحبة (السرس) فتنعم وتضاف كمادة غش للنخالة ، قوالح الذرة المفرومة أو المسحوقة ، المواد المعدنية أو الشوائب الأرضية أو الرمل ، وهي إما علامة للقذارة أو وسيلة للغش، وقد وجدت مساحيق الطباشير والجبس الناعمة في مساحيق الشعير ، ووجد ملح الطعام في مساحيق الكسب ، وأرخص مادة غش هي الماء وتضاف لكسب البذور الزيتية .

وفحص المواد الغذائية نباتياً خصوصاً بالميكروسكوب ، يعطي نتائج هامة عن وجود بعض الأجسام الغريبة ، التي كثيراً ما تغش بها المواد الغذائية ، كقشور الحبوب ونشارة الخشب .

وهناك من الاختبارات السريعة التي تجرى للحكم على مادة علف من الحبوب المعرضة للمطر فأدت لتلفها فتكون قشورها غامقة ، فيؤخذ كمية من الحبوب هذه وتخرج الحبوب من قشورها وتفحص تحت عدسة مكبرة للميكروسكوب ، فوجود الحبوب ملونة بالإيوسين Eosin ، توضح أن هذه الحبوب تصلح للعلف . وجود حبوب حمراء يستدعى فحصها

أسفل ضوء فوق بنفسجي لإثبات إذا ما كانت معاملة بالكاربامين Carbamin (مادة كاوية Caustic) فتلونت، وللمقارنة يوضع على ورقة ترشيح قطرة من كل من محلول الإيوسين وقطرة من محلول الكاربامين بجانب الحبوب الملونة ، ففي الضوء فوق البنفسجي يتلون الإيوسين بلون (أصفر فاتح ، بينما الكاربامين بلون أحمر طوبي .

كما تفحص الحبوب بالعدسة المكبرة للتغييرات الخارجية الشكلية ، إذ يمكن تمييز الحبوب الناضجة من الأخرى الخضراء غير الناضجة ، إذا تواجدت الأخيرة بكثرة قلت القيمة الغذائية للحبوب ؛ لاحتوائها على نيترات أكثر من الناضجة ، وهذا يؤدي لاضطرابات هضم الكرش لزيادة النيتريت في الكرش مؤديا لتسمم Methaemoglopinae-mia . كما يفحص أضرار الدراس التي تكون في شكل جروح ميكانيكية في الحبوب مع وجود نموات فطرية في بعض الحبوب الفردية . الفحص للجروح الميكانيكية هام ، وكثرة وجود بخار يدل على أن الحبوب قد حصدت بمحتوى مائي عال ، فتكون فيما بعد عرضة أكثر للأضرار الميكانيكية أثناء عملية الدراس ، ولو بقت البكتريا والفطر في هذه الجروح، فإنها تصبح قادرة على الحياة ، وتتكاثر بدفء ورطوبة الحبوب ، وقد لا يتم ذلك إلا في الكرش ، إذ يبدأ نموها وتؤدي للفساد والعفن .

وفيما يلي طرق الحكم المتبعة في الحياة العملية لبعض مواد العلف الشائعة ، والتى إذا احتاجت اختبارات وفحوصاً أخرى فإن عينات منها ترسل للمعمل بعد الاختبارات النوعية التالية :

أ ـ الدريس :

١ ـ اختبار حسي	عدد النقط
المظهر : طبيعي اللون ـ غير متلون	١٠
متلون بسيط أو باهت ضعيف	٥
رمادي ـ باهت بشدة	صفر
متلون بيني مسود	ـ ١٠
متعفن جزئياً أو متسخ أو متلوث جزئياً	ـ ١٠
متعفن أو متلوث بشدة	ـ ٢٠
الرائحة : جيد الرائحة	٥
فاتر إلى عديم الرائحة	صفر
محترق بسيط إلى رائحة غريبة	ـ ٥
محترق بشدة ـ عفن ضعيف	ـ ١٠

١ ـ اختبار حسي	عدد النقط
عفن بشدة	١٠
الملمس : طري وناعم (غنى بالأوراق عديم السوق الصلبة)	٥
صلب جزئياً (فقير الأوراق مع قليل من السوق الصلبة)	صفر
خشن (عديم الأوراق مع غناه بالسوق الصلبة)	ـ ٥
متخشب (سوق متخشبة كثيرة جداً)	ـ ٥
طري (أعلى من ٢٠٪ رطوبة) للدريس المخزون	ـ ١٠
طري جـداً حـتى رطب (أعلى من ٢٥٪ رطوبة) للدريس	
المخزون	٥
التلوث : (بالتربة والتراب والقش وبقايا الروث .... إلخ)	صفر
خالي الأجزاء والمكونات الغريبة عاليه	ـ ١٠
تلوث بسيط ـ آثار من العفن	ـ ٢٠
تلوث شديد ـ أتربة عفنة كثيرة ـ قليل من السوس	
تلوث شديد جداً ـ عفن كثير جداً ـ كثير من السوس	

هذا ويمكن إعطاء درجات بينية عما ذكر عاليه حسب الحالة للدريس .

٢ ـ اختبار نباتي :

وفيه يخصم ٠,٣ نقطة لكل ١٪ من الحشائش قليلة القيمة الموجودة مثل : حشيشة الزمار ، فطريات السلك ، الرتم ، الحلفا ، بوط ، سمار ، ذيل الحصان ، السرخس ، الخلنج ، ست الحسن ، وغيرها .

كما يخصم ١٠ نقط في حالة تواجد كل ١٪ من الحشائش الضارة مثل : الخنشار ، سورنجان ، كرات .

التقييم : ٢٨ – ٣٠ درجة ⟵ ممتاز
٢٤ – ٢٧ درجة ⟵ جيد جداً
١٨ – ٢٣ درجة ⟵ جيد
١٠ – ١٧ درجة ⟵ مقبول

٤ – ٩ درجة ← عديم القيمة

أقل من ٤ درجة ← غير قابل للاستعمال.

ب السيلاچ :

١ ـ اختبار حسي :

الرائحة	عدد النقط
خالي من حمض البيوتريك ـ حامضى خفيف أو كرائحة الثمار أو الخبز	١٤
آثار من حمض البيوتريك (بقبضة يد) ـ حامضى بشدة ـ لاسع الرائحة ـ رائحة حمض ضعيفة للسيلاج المجفف قبل السيلجة	٨
رائحة معتدلة لحمض البيوتريك ـ رائحة حمض شديدة ـ رائحة عفنة شديدة	٤
رائحة حمض بيوتريك قوية أو رائحة أمونيا أو عفن قوية مع رائحة حامضية ضعيفة جداً	٢
رائحة تلف أو عفن شديدة	صفر
التركيب	
الاحتفاظ بالأوراق والسوق	٤
عدم الاحتفاظ بالأوراق بشدة	٢
عدم الاحتفاظ بتركيب الأوراق والسوق بشدة أو تلوث بالعفن بسيط أو قذارة بسيطة	١
تعفن الأوراق والسوق بشدة أو قذارة شديدة	صفر
اللون	
اللون يناسب لون مادة العلف الخضراء وفى المواد سابقة التجفيف قبل السيلجة يكون اللون بنياً بسيطاً	٢
تغيير بسيط في اللون (أصفر أو بني)	١
تغيير شديد في اللون (إزالة اللون ، اصفرار باهت ، اغمقاق شديد)	صفر

الحكم : ١٨ - ٢٠ درجة ← جيد جداً
١٤ - ١٧ درجة ← جيد
١٠ - ١٣ درجة ← مرضي
٧ - ٩ درجة ← مقبول
٥ - ٦ درجة ← سيئ
صفر - ٤ درجة ← سيئ جداً (تالف) .

٢ ـ نموذج لاختبار طبيعي بقياس قيم PH (اللوغاريتم السالب أيون لتركيز الأيدروچين) :

التقدير	قيم PH طبقاً للمادة الجافة إذا كانت			عدد النقط المضاف للنقط السابقة	العدد الكلي للنقط
	حتى ٢٠٪	٢٠ - ٣٠٪	أعلى من ٣٠٪		
جيد جداً	‹ ٣,٧	‹ ٤,٠	‹ ٤,٥	١٠	٢٥ - ٣٠
جيد	٣,٧ - ٤,١	٤,٠ - ٤,٥	٤,٥ - ٥	٧	١٨ - ٢٤
مرضي	٤,٢ - ٤,٦	٤,٦ - ٥,٠	٥,١ - ٥,٥	٤	١٢ - ١٧
مقبول	٤,٧ - ٥,١	٥,١ - ٥,٥	٥,٦ - ٦,٠	٢	٥ - ١١
سيئ	٥,٢ - ٥,٦	٥,٦ - ٦,٠	٦,١ - ٦,٥	صفر	صفر - ٤
تالف	‹ ٥,٦	‹ ٦,٠	‹ ٦,٥	صفر	صفر - ٤

٣ ـ كيفية الاستدلال على المحتوى المائي لسيلاج الحشائش حسياً :

محتوى مائي ٪	ظهور العصير
أعلى من ٨٠	يخرج عصير كثير بالضغط بقبضة اليد
حوالى ٧٥	يخرج عصير قليل بالضغط بقبضة اليد

جـ ـ حبوب الغلال :

١ ـ المظهر :

* الحجم : صغير ، متوسط ، كبير ، غير متجانس .

* الشكل : مثالى ، مسطح ، كامل الاستدارة ، مكسر ، منكمش .

* اللون : طبيعى ، رمادى ، أسود ، شاحب (مغسول) ، محمر (معامل بالكيماويات)، أخضر (شوفان) ، أزرق (مدنتر) .

* حالة الإنبات : لم تتغير ، منبت ، تلونت (رمادى ، أسود) .

* المقطع : الجسم الدقيقى (إندوسيرم) تلون بالأبيض أو الغامق .

* السلامة : ثقوب ، خدوش ، وغيرها من الجروح .

٢ ـ الرائحة :

لم تتغير ، عفن ، حامضى ، متزنخ ، وغيرها من الروائح الغريبة (زيوت ، كيماويات) .

٣ ـ الطعم :

مضغ الشوفان : طعم دقيقى أو طعم النقل (جوز) ، وأخيراً حلو (طبيعى) ، الطعم المر راجع لإصابة فطرية أو حصاد مبكر .

٤ ـ التلوثات :

حبوب غريبة ، حراشيف ، بذور حشائش ، فطريات ، أتربة ، حصى ، زجاج ، روث ، فئران ، حشرات ، ... إلخ .

٥ ـ الكثافة :

كثافة الشوفان	اللـــون	القيمة الغذائية
› ٦٠٠ جم / لتر	المقطع شاحب	جيدة جداً
٥٥٠ ـ ٦٠٠ جم/لتر	المقطع شاحب	جيدة
٥٠٠ ـ ٥٥٠جم/لتر	المقطع شاحب	متوسطة
‹ ٥٠٠ جم / لتر	المقطع شاحب	أقل فائدة
‹٥٠٠ جم / لتر	حبوب خضراء معفنة مقطعها رمادى	غيـر قـابلة للاسـتـعـمـال

د ـ مواد العلف فى صورة مساحيق أو شرائح أو بذور :

١ ـ الرائحة :

يوضع ١٠ ـ ٢٠ جم مادة علف فى كأس زجاجى مع ماء دافئ (١٠ ـ ٥٠° م) ،

ويغطى الكأس بزجاجة ساعة ، ثم يختبر الرائحة .

أو يوضع ٢٠ ـ ٣٠ جم مادة علف فى دورق مخروطى سعة ٢٠٠ مل ويسد جيداً بسدادة قطن طبى ، ويسخن (جاف) على ٣٥°م لمدة ٣٠ دقيقة فى فرن تجفيف .

الحكم : يوضح الانحراف عن الرائحة الطبيعية المثالية لمادة العلف مدى التلف الحادث كالتالى :

رائحة حلوة : إصابة بالسوس .

رائحة عفنة : تخزين رطب جداً ، إصابة بالفطر ، والبكتريا .

رائحة متزنخة حامضية : هدم عام لمادة العلف .

رائحة أمونيا : هدم لمواد العلف الغنية بالبروتين .

وتشير الرائحة بانحرافاتها كذلك إلى ضآلة النظافة مثل مسحوق السمك وإضافة مسحوق الحيتان إليه ، أو الأعلاف الأخرى ووجود زيت الخردل بها .

٢ ـ المظهر :

للحكم الأفضل تجزأ العينة بالنخل، باستعمال مناخل سعة ثقوبها ١ ، ٠,٥ ، ٠,١ م، وتوضع العينة المجزأة بالمناخل كل ناتج منخل على ورقة ، ويفضل أن يكون لونها مضاداً للون العينة .

الجزء الخشن : (الذى حجم جزئياته أكبر من ١م) ويتضمن :

أنواع الحبوب (لون القشرة ، شكل الحبة ، حبوب غير مجزأة) .

المكونات الأخرى : شرائح جافة ، إنباتات شعير ، مسحوق سمك (شوك ، قشور) .

وجود مكونات غريبة : بذور ، حراشيف ، قشور ، قرون ، حصى ، زجاج ، معادن ، خنافس ، يرقات أو أجزاء منها ، روث فئران ، كريستال ، تكتل .

الجزء الناعم (أقل من ١م) :

ويحكم على مدى وجود السوس ، إذ تمر السوس بأكبر كمية من المنخل سعة ٠,٥ م، ولا تمر من المنخل سعة ٠,١ م ، فتوضع العينة الناعمة مفروشة مسطحة وتضغط معاً وتلاحظ التغييرات السطحية .

٣ ـ اختبار التحميص لشرائح مستخلصات فول الصويا :

يجرى التحميص (أو التسخين بالبخار) لشرائح مستخلص فول الصويا أثناء الإنتاج ، بهدف استبعاد بقايا المذيبات ، وفى نفس الوقت يتبع ذلك ارتفاع لمعدل هضم البروتين ، نتيجة دنترة أحد مثبطات التريبسين ، وكذا استبعاد المواد المرة .

وكمقياس للتحميص استخدمت الدنترة ، أو تناقص نشاط أحد الإنزيمات الحساسة

للحرارة ، سهلة الكشف ، وهو اليورياز Arease . يعمل اليورياز على تحليل اليوريا إلى نشادر وثانى أكسيد كربون . ويمكن قياس النشادر NH_3 بورق دليل PH فى الطبقة الغازية . الشرائح جيدة التحميص تظهر نشاط يورياز ضئيل ، وعليه يتحول لون ورق الدليل ببطء . يقدر نشاط اليورياز المتبقى فى فول الصويا بطحن العينة دون رفع درجة الحرارة نتيجة الطحن ، يوزن ٠,٢ جم فى أنبوبة اختبار مع ١٠ مل محلول منظم (١٥ جم يوريا / ٥٠٠ مل محلول منظم فوسفات مكون من ٣,٤٠٣جم فوسفات بوتاسيوم أحادى القاعدة مذابة فى ١٠٠ مل ماء + ٤,٣٥٥ جم فوسفات بوتاسيوم ثنائية القاعدة مذابة فى ١٠٠ مل ماء، ويخلط المحلولان معاً ويخففان إلى ٥٠٠ مل بالماء ويضبط PH على ٧ بواسطة حمض هيدروكلوريك ٦ ع وصودا كاوية ٤٠٪) ، وتخلط وتحضن فى حمام مائى على ٣٠ْم .

يعد تجربة خالية من ٠,٢ جم عينة + ١٠ مل محلول منظم فوسفات والخلط والتحضين .

تخلط العينة والتجربة الخالية كل ٥ دقائق ويزالا من الحمام المائى بعد نصف ساعة . وينقل الرائق إلى كأس نظيف ، ويقدر قيمة PH فيه . ويعبر عن التغيير فى قيمة PH فيما بين العينة والتجربة الخالية كدليل لنشاط اليورياز .

٤ ـ الفحص الفطرى فلورسنتيا :

بفحص عينات كثيرة جداً من بذور القطن المصابة أليافها بفطر أسبرجلس فلافس ، بدت لها فلورسنس أصفر مخضراً ، وما كان لها فلورسنس كانت ملوثة بتركيزات عالية من أفلاتوكسين ب١ (الذى ينتجة الفطر المذكور عاليه) . البذور الملحوظ عفنها بالعين المجردة، ولم يظهر لها فلورسنس لم تكن ملوثة كذلك بالأفلاتوكسين أو ملوثة بأقل التركيزات . أعطت كل سلالات الفطر المعزولة فلورسنسا أصفر مخضراً فى ألياف القطن الحية ، بينما لم تعط فطريات الحقل الأخرى نفس الفلورسنس ، مما يظهر أهمية هذا الاختبار فى إظهار البذور الملوثة بالسم الفطرى أفلاتوكسين عند الحصاد . اجر نفس الاختبار النوعى هذا على نباتات أخرى عديدة خلاف القطن (فول سودانى ، فول صويا ، ذرة وخلافها) ، فوجد أن الفطر المذكور ينتج حمض الكوجيك Kojic acid (كناتج ميتابوليزمى للفطر) يتحول إلى مركب فلورسنتى تحت تأثير إنزيم البيروكسيداز فى النباتات .

وترتبط القيمة الغذائية للعلف بكثافته ، فزيادة الكثافة تشير إلى زيادة مجموع المواد الغذائية المهضومة TDN وانخفاض محتوى الألياف فى مادة العلف كما يصورها الجدول التالى :

مادة العلف	TDN	الكثافة جم/لتر	٪ ألياف
حبوب قمح	٨٠	٨١٠	٤
حبوب ذرة	٨٠	٧٥٠	٢
حبوب جويدار	٧٥	٧٥٠	٢
حبوب شعير	٧٠	٥٦٠	٦
حبوب شوفان	٦٥	٣٥٥	١٠
ردة قمح	٥٧	٢٥٥	٩
نخالة شوفان	٢٣	١٥٠	٢٧

وكذلك يرتبط ارتفاع كثافة العلف بزيادة قابليته للتكعيب والعكس بالعكس ، كما يوضح ذلك الجدول التالى :

مادة العلف	الكثافة جم/لتر	قابليته للتكعيب
ردة قمح	١٧٠ - ٢٥٠	منخفضة
برسيم حجازى مجفف	٢٥٠ - ٢٨٠	منخفضة
رجيع أرز	٣٢٠ - ٣٣٠	منخفضة
مسحوق كوبرا	٤٣٠	منخفضة
مسحوق نوى بلح	٥٠٠	منخفضة
مسحوق دم	٦١٠	منخفضة
ناتج تبييض أرز	٤٨٠	متوسطة
مسحوق سمك	٤٨٠ - ٦٤٠	متوسطة إلى منخفضة
كسب بذور قطن	٥٩٠ - ٦٤٠	متوسطة
كسب فول سودانى	٤٦٠	عالية
كسب فول صويا	٥٦٠ - ٦٠٠	عالية
كسب كتان	٥٩٠ - ٦٤٠	عالية

٥ ـ الكثافة :

تعتبر كثافة الحبوب ، وغيرها من محاصيل العلف المختلفة ، من الاختبارات الطبيعية الواجب إجراؤها .

وتعد كثافة العينة (أى وزن حجم معين) دليلاً جيداً عن جودة هذه المادة ، وفيما يلى الحد الأدنى القياسى لكثافة بعض المحاصيل العلفية :

مادة العلف	جم/ ١٠٠سم٣
شعير (حبوب)	٦٧,٠ (٦٥,٩)
ذرة (حبوب)	٧٧,٠ (٦٩,١)
شوفان	٤٧,٠
سورجم	٦٧,٠
قمح (حبوب)	٧٣,٠ (٧٢,٧)
مسحوق دريس	٣٧,٨
شعير (مطحون)	٥٩,١
مسحوق دم	٨٥,٩
مسحوق سمك	٦١,٦
ذرة (مطحون)	٥٧,٩
حمص (حبوب)	٧٨,٨
حمص (مطحون)	٥١,٦
قمح (مطحون)	٥٦,٧
نخالة قمح جافة	١٥,٣
نخالة قمح مبللة	٢٠,٣
كسب فول سودانى	٦١,٦

وتفيد المراجع التالية فى مزيد من الدراسة :

- Calich, V . L. G. et al. (1978) My copathologia, 66 : 175

- Dickens, G. W. & Welty, R. E (1975) J . Aocs , 52 : 448 .

- Holzschuh, W. & Schmidt , H. (1963) Silage - Herstellung - Futterung . Veb Deutscher Landwirtschafsverlag, Berlin .

- Leitgeb, R. (1979) Futtermittelkunde, Vorlesungen, Univ. Boku . Wien .

- Marsh , P. B. et al . (1969) J. Agr. Food Chem . 17:462 & 468 .

- Meyer, H. et al. (1980) Supplemente Zu Verlesungen und Übungen in der Tierer-
nohrung . 5 . Auflage, Sprungmann Verlag, Hannover

Thalmann, A. & Moller (1973) Die BodenKultur , 24:402.

الفصل الثانى

الماء والكائنات المائية والتربة

أ ـ الماء

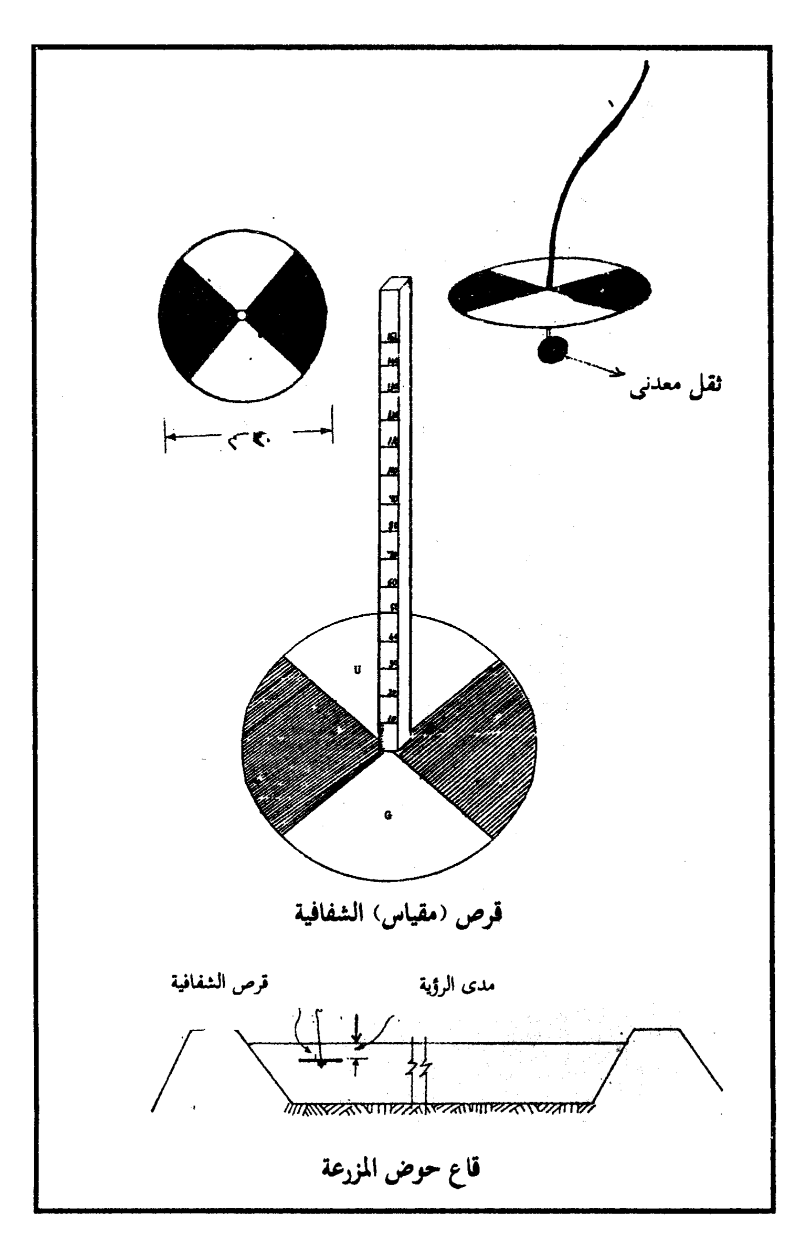
١ ـ قياس شفافية الماء باستخدام عمق قرص سيشى :

Water Transparency by Secchi Disc Depth

يعرف العمق بالمتر ، والذى يبدو عنده قرص أبيض (يسمى قرص سيشى) عند خفضه رأسياً فى ماء عميق ، بمقياس الشفافية للماء ، وهذا المقياس رغم رخصه ، إلا أنه يعتمد على القائم بملاحظته ، وعلى الإضاءة لأى ضوء مفاجئ ، وعلى الوقت من اليوم ، وظروف الجو ، فهو يعتمد أساساً على امتصاص الضوء فى الماء ، والذى يختلف كثيراً لأسباب منها الطين المعلق ، وجزيئات الطمى ، ونواتج هدم البكتريا ، والجزيئات العضوية المعلقة ، والكائنات البلانكتونية (خاصة البلانكتون النباتى سواء الحى منها أو الميت) ، والمركبات الدوبالية والملونة Coloured Humic Compounds (الناتجة من الأعفان والتربة) . وعمق قرص سيشى يرتبط عكسياً مع العكارة ، ويقدر ظروف وفرة الضوء (فى عمود الماء) اللازم للبناء الضوئى فى البلانكتون النباتى .

وهذا المقياس مهم فى أحواض السمك ، خاصة العميق منها ؛ للدلالة على إنتاجية الماء ، وبجانب تسجيل عمق قرص سيشى ، أيضاً مهم تسجيل لون الماء ، والذى يدل على السبب الرئيسى فى امتصاص الضوء ، مثلاً اللون الأخضر أو الأخضر المزرق يدل على تركيزات عالية من البلانكتون النباتى ، بينما اللون الأحمر أو الرغاوى Scum السطحية ربما تكون طحالب سامة Toxic Dinoflagellates (مثل Prymnesium parvum فى الماءالعذب ، Gyrodinium spp. Gonyaulax فى البحر) ، والعكارة البنية اللبنية تدل على مستوى عال من العوالق غير العضوية ، والأصفر أو البنى الرائق لتأثير المركبات العضوية من المستنقع أو الوحل أو الأحراش . وكل هذه الأسباب يتأكد منها بتحليل عينات الماء للعوالق الصلبة والبلانكتون .

والجهاز عبارة عن قرص ألمونيوم ، بقطر ٢٥ ـ ٣٠ سم ، مدهون بطلاء أبيض ويوصل بقائم ، معلم بعلامات عند ١ م ثم على مسافات كل ٥ سم ، ويمكن استخدام قرص من الخشب ، وفى هذه الحالة يجب توصيله بوزن ثقيل لتغطيسه . وقد يقسم القرص أرباعاً كل ربع بلون أسود ثم أبيض ، على الترتيب .



شكل (٢٥) قياس مدى الرؤية بمقياس الشفافية

ويفضل القياس حول منتصف النهار ، بخفض قرص سيشى ببطء فى الماء ، مع حفظ القائم (سلك أو خلافه) فى وضع رأسى ، ويسجل العمق الذى عنده يبدأ القرص فى الاختفاء (ع١) ، ثم يرفع تدريجياً حتى بداية ظهور القرص ثانية ، فيسجل هذا العمق (ع٢) ، فيكون عمق قرص سيشى عبارة عن المتوسط أى (ع١ + ع٢) ٢/ م .

وهذا مقياس تقريبى للبلانكتون الكلى (والذى يمكن استنتاجه كذلك من تقدير المادة العضوية) وللإنتاجية الأولية (كلوروفيل a) ولعدد من الهوائم النباتية .

٢ ـ نشاط أيون الهيدروجين PH الماء :

قياس نشاط أيون الهيدروجين فى محلول ، يعبر عنه بالأس السالب لتركيز الهيدروجين، وهو من خواص الماء الهامة للأسماك ، إذ أن القيم المتطرفة لتركيز أيون الهيدروجين تسبب ضغوطا للسمك ، خاصة على سطح الخياشيم ، ويستخدم تركيز أيون الهيدروجين مع قلوية التنقيط Titration Alkalinity فى تقدير ثانى أكسيد الكربون الحر والكلى . كما أن تركيز أيون الهيدروجين يؤثر على درجة تأين المواد السامة كالأمونيا ، كما أنه حساس للاتزان بين التمثيل الضوئى والتنفس فى الكائنات المائية ، وتختلف قيمته على مدار اليوم.

وهناك نوعان من طرق قياس تركيز أيون الهيدروچين PH فى الماء هما :

١ ـ طرق لونية colorimetric : تعتمد على إضافة محاليل دلائل حساسة إلى العينة ، ومقارنتها بألوان قياسية معلومة قيم PH ، وكذلك هناك أوراق حساسة تغمس فى الماء فيتغير لونها فيختبر هذا اللون مقابل ألوان قياسية معلومة قيم PH .

٢ ـ طرق ألكترودية Electrometric : متعددة الأنواع حسب الجهاز المستخدم .

ويقدر PH بواسطة ورق دليل ملون Multi-Range Papers، والأدق باستخدام جهاز PH بإلكترود زجاج ، والذى يتكون إلكتروده من بصلة من زجاج رقيق ، تحتوى محلول منظم موصل للتيار ، وبها قطب من الكالوميل (زئبق / كلوريد زئبق) أو الفضة (فضة / كلوريد فضة) حساس لأيونات الهيدروجين ، وقطب آخر من الكالوميل ، مغمس فى محلول مشبع كلوريد بوتاسيوم ، يتصل كهربياً بالمحلول الخارجى بواسطة ألياف مسامية .

ويؤدى الفرق فى نشاط أيون الهيدروجين بين المحلول الخارجى والمحلول المنظم داخل الإلكترود الزجاجى إلى خلق فرق جهد يمكن قياسه ، وهو يتناسب مع لوغاريتم نشاط أيون الهيدروجين فى المحلول . ويجب مراعاة درجة الحرارة ؛ لأنها تؤثر على القراءة فيضبط الجهاز لدرجة الحرارة .

ويجب تقدير PH فى خلال ساعات قليلة عقب جمع العينة ؛ لتأثرها بالنشاط البيولوجى . ويجب خلط العينة قبل أخذ القراءة ، مع عدم ملامسة الالكترود لجوانب إناء العينة ، ويجب معايرة الالكترود أولاً ، بغمسه فى محلول منظم على نفس درجة حرارة العينة ، مع ضبط درجة حرارة الجهاز لقراءة PH الصحيحة كما فى الجدول التالى :

درجة الحرارة مْ	فثالات	فوسفات	بورات
صفر	٤,٠١	٦,٩٨	٩,٤٦
٥	٤,٠٠	٦,٩٥	٩,٣٩
١٠	٤,٠٠	٦,٩٢	٩,٣٣
١٥	٤,٠٠	٦,٩٠	٩,٢٧

محاليل منظمة شائعة الاستعمال تجارياً على درجات حرارة مختلفة :

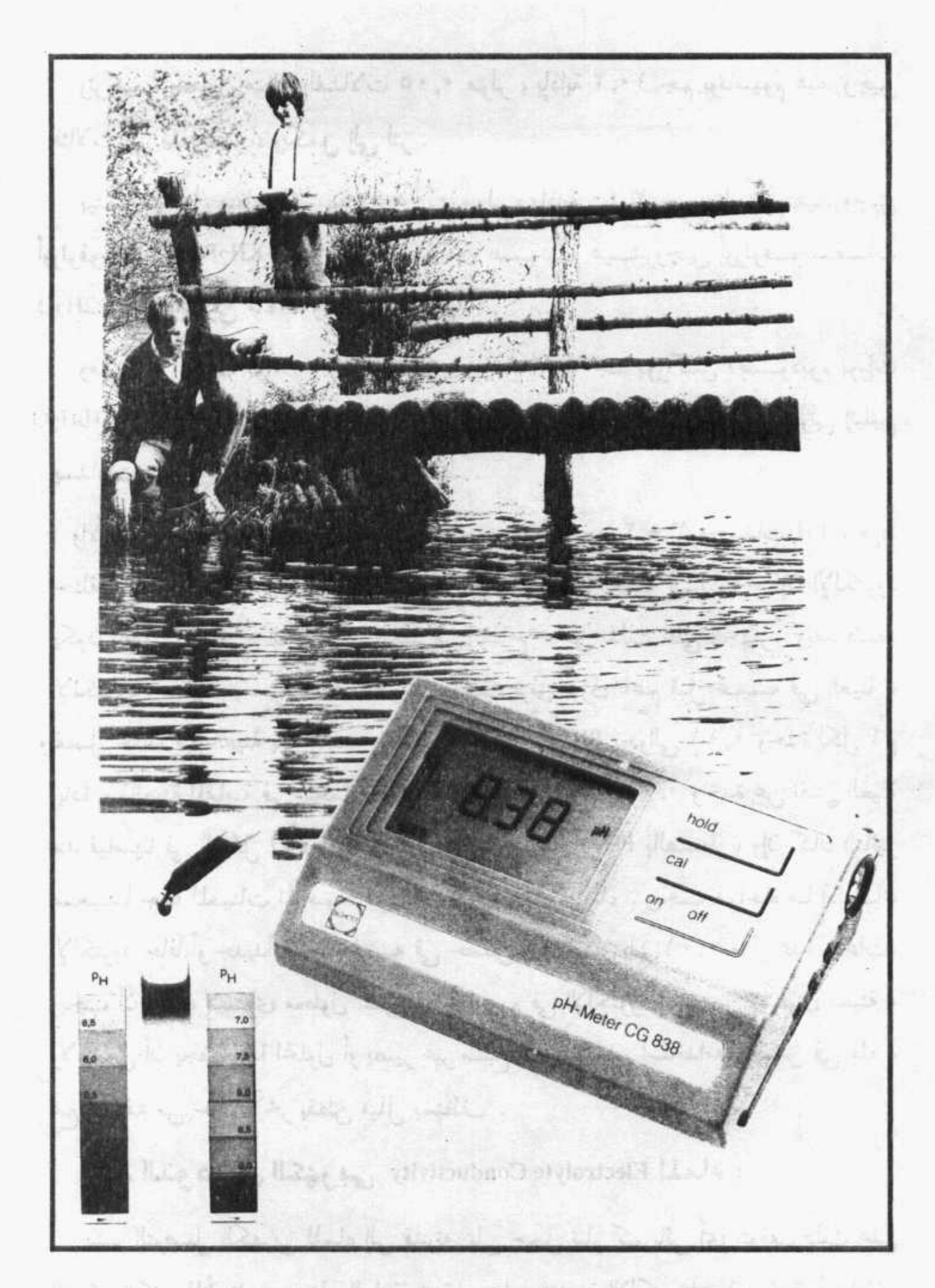
درجة الحرارة مْ	فثالات	فوسفات	بورات
٢٠	٤,٠٠	٦,٨٨	٩,٢٢
٢٥	٤,٠١	٦,٨٦	٩,١٨
٣٠	٤,٠١	٦,٨٥	٩,١٤

وتركيب محلول منظم الفثالات ٠,٠٥ مولر ، بإذابة ١٠,٢ جم بوتاسيوم هيدروچين فثالات فى ماء مقطر ، ويكمل إلى لتر .

بينما محلول منظم الفوسفات ٠,٠٥ مولر ، بإذابة ٣,٤٠ جم بوتاسيوم هيدروچين أورثوفوسفات KH_2PO_4 ، مع ٤,٤٥ جم دى صوديوم هيدروچين أورثوفوسفات $Na_2HPO_4.2H_2O$ فى ماء ، ويخفف إلى لتر .

ومحلول منظم بورات ٠,٠١ مولر ، بإذابة ٣,٨١ جم بوراكس (صوديوم بورات $Na_2B_4O_7.10H_2O$) فى ماء ، ويخفف إلى لتر . وتحفظ هذه المحاليل فى أوانى بولى إثيلين بسدادات . مع وضع نقط كلوروفورم للحفظ .

والأفضل معايرة الجهاز بمحلولين منظمين ، بينهما ٢ - ٣ وحدات PH، فإذا اختلفت القراءة الثانية بمعدل أكثر من +٠,١ وحدة عن القيمة السليمة ، فإن الإلكترود يكون تالفاً ، أو يحتاج الجهاز إلى ضبط من مفتاح خاص بذلك على الجهاز . وبعد ضبط الإلكترود ومعايرته يغسل بماء مقطر ، ويجفف برفق بورق ناعم قبل غمسه فى العينة ،



شكل (٢٦) طرق قياس PH الماء
كهربياً وبسائل الدليل الملون

وتركيب محلول منظم الفثالات ٠,٠٥ مولر ، بإذابة ١٠,٢ جم بوتاسيوم هيدروچين فثالات فى ماء مقطر ، ويكمل إلى لتر .

بينما محلول منظم الفوسفات ٠,٠٥ مولر ، بإذابة ٣,٤٠ جم بوتاسيوم هيدروچين أورثوفوسفات KH_2PO_4 ، مع ٤,٤٥ جم دى صوديوم هيدروچين أورثوفوسفات $Na_2HPO_4.2H_2O$ فى ماء ، ويخفف إلى لتر .

ومحلول منظم بورات ٠,٠١ مولر ، بإذابة ٣,٨١ جم بوراكس (صوديوم بورات $Na_2B_4O_7.10H_2O$) فى ماء ، ويخفف إلى لتر . وتحفظ هذه المحاليل فى أوانى بولى إثيلين بسدادات . مع وضع نقط كلوروفورم للحفظ .

والأفضل معايرة الجهاز بمحلولين منظمين ، بينهما ٢ - ٣ وحدات PH ، فإذا اختلفت القراءة الثانية بمعدل أكثر من +٠,١ وحدة عن القيمة السليمة ، فإن الإلكترود يكون تالفاً ، أو يحتاج الجهاز إلى ضبط من مفتاح خاص بذلك على الجهاز . وبعد ضبط الإلكترود ومعايرته يغسل بماء مقطر ، ويجفف برفق بورق ناعم قبل غمسه فى العينة ، ويفضل غسله من العينة بعد غمسه فيها . وتنخفض قيم PH بحوالى ٠,٠١ وحدة لكل ١°م زيادة ، فالعينة المقاسة فى المعمل (٢٥°م) قد تنخفض بحوالى ٠,٢ وحدة عن نفس العينة عند قياسها فى الحقل (٥°م مثلاً فى الشتاء) ، كما تتأثر PH بالضغط ، وإن كان التأثير ضعيفاً جداً للعينات المأخوذة فوق ٥٠٠م عن سطح الماء . ويجب مراعاة ما إذا كان الإلكترود جافاً أو جديداً فيجب غمسه فى حمض هيدروكلوريك ٠,٠١ مولر عدة ساعات، ويجب أن يكون مستوى محلول كلوريد البوتاسيوم فى الإلكترود أعلى من مستوى العينة ، ولا ينبغى أن يجف هذا المحلول أو يصير غير مشبع ، وعند عدم استخدامه فيغمس فى ماء ، مع تنظيفه من حين لآخر بقطن مبلل بمنظف .

٣ - التوصيل الكهربى Electrolyte Conductivity للماء :

يشير التوصيل الكهربى للماء إلى قدرته على حمل تيار كهربائى أى يتوقف ذلك على التركيز الكلى للأيونات ، وهذه العلاقة تتوقف على هندسة الإلكترودات (مساحة ومسافة)، ودرجة الحرارة ، وكذلك على طبيعة الأيونات الأعظم فى المحلول . وتعبر النتائج عادة عند درجة حرارة ٢٠°م أو ٢٥°م .

وهناك علاقة واضحة للماء عند درجة حموضة (PH) ٥ ـ ٩ هى :

$$X \sim 0.01K$$

حيث X = مجموع تركيزات الأيونات السالبة والموجبة بالمللى مول / لتر .

K = التوصيل الكهربى معبراً عنه بالميكروسيمينز / سم .

حيث السيمينز (S) Siemens وحدة دولية حديثة ، حلت محل الوحدة السابقة (mho) أو (Ω^{-1}) والتى تعبر عن المقاومة الكهربية .

فعلاقة التوصيل الكهربى بالمقاومة الكهربية يعبر عنها بالعلاقة :

$$K = C \times 1/R$$

حيث C ثابت خاص بزجاج الخلية تعينه الشركة المنتجة .

وهناك مقياس توصيل كهربى يعمل بالبطارية للعمل الحقلى ، مكون من خلية توصيل ذات إلكترود من الكربون . يجب حفظ الإلكترود نظيفاً . يجب قياس درجة حرارة الماء فى نفس الوقت . عند القياس على درجة حرارة خلاف ٢٥°م فإن القيم المقدرة للتوصيل الكهربى يجب تعديلها بالضرب فى المعامل المستخرج من الجدول التالى :

العوامل اللازمة لتحويل توصيل الماء إلى توصيل كهربى على ٢٥°م .

درجة الحرارة م°	العامل	درجة الحرارة م°	العامل	درجة الحرارة م°	العامل
٣	١,٦٢	٤	١,٥٨	٥	١,٥٤
٦	١,٥٠	١٥	١,٢١	٢٤	١,٠٢
٧	١,٤٦	١٦	١,١٩	٢٥	١,٠٠
٨	١,٤٢	١٧	١,١٦	٢٦	٠,٩٨
٩	١,٣٩	١٨	١,١٤	٢٧	٠,٩٧
١٠	١,٣٦	١٩	١,١٢	٢٨	٠,٩٥
١١	١,٣٣	٢٠	١,١٠	٢٩	٠,٩٣
١٢	١,٣٠	٢١	١,٠٨	٣٠	٠,٩٢
١٣	١,٢٧	٢٢	١,٠٦	٣١	٠,٩٠
١٤	١,٢٤	٢٣	١,٠٤	٣٢	٠,٨٩

الماء شديد الحموضة (PH أقل من ٤,٥) أو القلوية (PH أكبر من ١٠) يعكس توصيل كهربي عال عن المتوقع الحصول عليه من التركيز الكلى للأيونات ؛ لزيادة التوصيل الجزيئى لأيونات الهيدروجين أو أيونات الهيدروكسيل ، وهناك تصحيح آخر لهذه الأيونات . وفى المياه عالية التوصيل (أكثر من ١٠٠٠ مكيرو سيمينز / سم) كالماء الشروب ، فإن التوصيل الجزيئى يكون منخفضاً ؛ لانخفاض التأين ، ففى هذه الحالة يمكن تخفيف المياه بماء غير متأين قبل قياس التوصيل الكهربى ، مع التصحيح لهذا التخفيف .

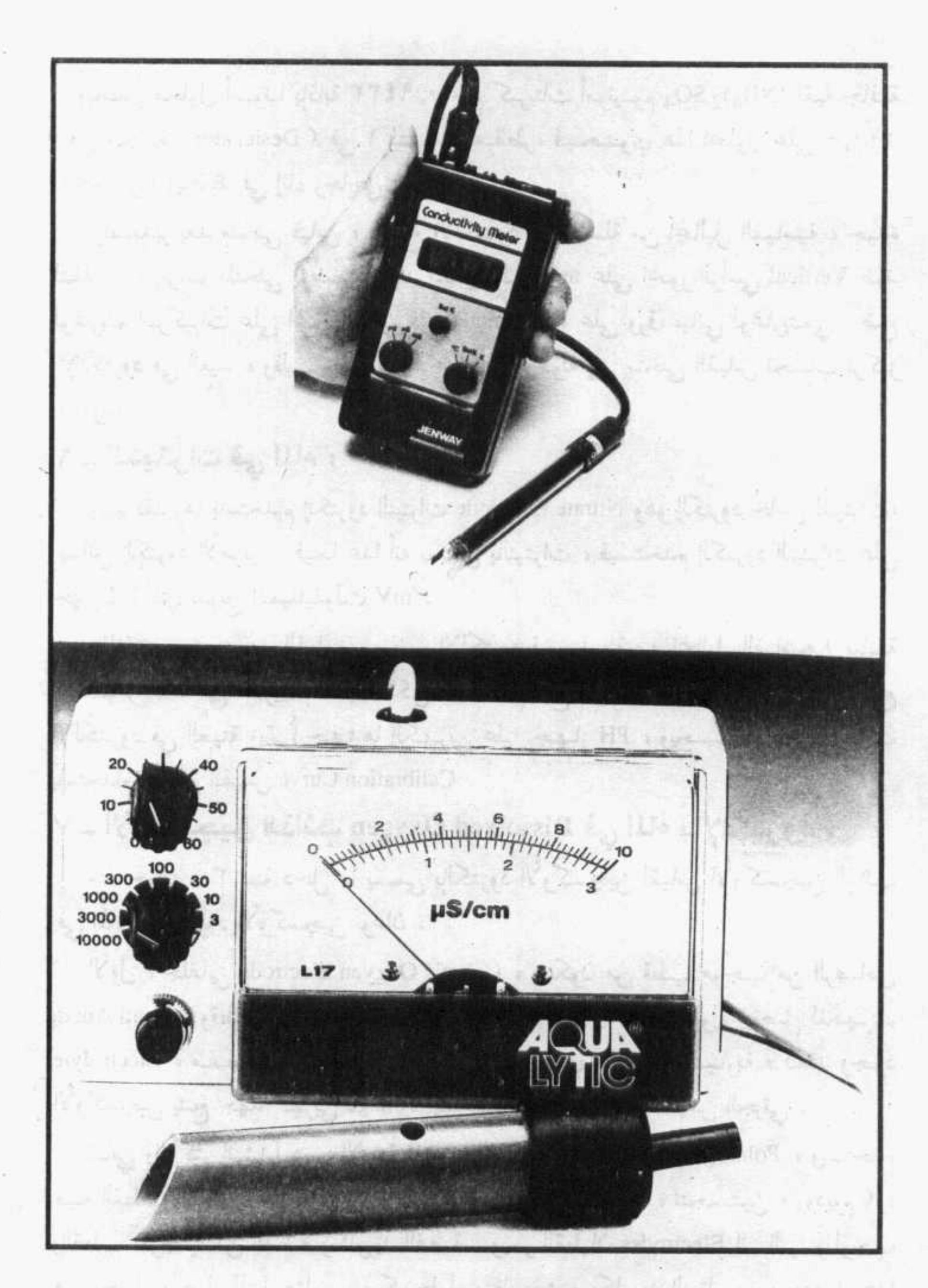
ولا تتطلب الزراعة المائية دقة متناهية فى هذا القياس ؛ لأن التوصيل الكهربى هنا يوظف كدليل مبدئى للتلوث . بينما التقديرات الدقيقة تجرى فى المعمل على عينات ماء على ٢٥°م فى حمام مائى ، مع الرجوع إلى محلول قياسى كمرجع للمقارنة ، مثل محلول كلوريد البوتاسيوم .

٤ ـ الملوحة للماء :

تستخدم أجهزة لقياس الملوحة Salinometer تعتمد على قياس التوصيل الكهربى ودرجة حرارة الماء وتستشهد بجداول خاصة ، ومع ذلك فطريقة تنقيط موهر كافية ومفيدة للمعامل الحقلية غير المجهزة بأجهزة قياس الملوحة هذه ، إلا أن عيب هذه الطريقة فى ارتفاع سعر نترات الفضة ، إذ أن كل ١٠ مل ماء بحر يتطلب حوالى ١ جرام نترات فضة $AgNo_3$. فإذا تطلب الأمر قياس الملوحة باستمرار وفى أعماق مختلفة ؛ فإنه أفضل وأرخص أن تستعمل الكترودات تعمل بالبطارية لقياس الملوحة والحرارة ، ومن الطرق الحقلية الأقل دقة لقياس الملوحة هى استخدام الهيدرومتر Hydrometer المعاير مباشرة على الملوحة ، مع قياس حرارة الماء أو باستخدام رفركتومتر Refractometer .

٥ ـ الأمونيا فى الماء :

تقدر باستخدام إلكترود الأمونيا Amonia Ion Electrode ، وهو عبارة عن إلكترود حساس ، ذو غشاء داخلى رقيق ، يتولد فيه جهد يتناسب مع تركيز الأمونيا فى العينة . فبعد معايرته ، تقرأ تركيز الأمونيا مباشرة على جهاز PH / ميلليفولت . وهذا التكنيك يمكن استخدامه في قياس الأمونيا غير المتأينة في تانكات السمك . ولقياس الأمونيا الكلية (متأينة وغير متأينة) يجب إضافة قلوي للعينة . ويستخدم لذلك إلكترود أيون الأمونيا مع جهاز PH ذي تدريج لقراءة الميلليفولت .



شكل (٢٧) أجهزة قياس التوصيل
الكهربى للماء بحجم الجيب

ويحضر محلول أمـونيا بإذابة ٠,٩٤٣٣ جم كبريتات أمونيـوم $(NH_4)_2 SO_4$ نقية جافـة (في مـجـفف Desiccator) في ١ لتـر مـاء مـقطر، فـيـحـتـوي هذا المحلول على ٢٠٠,٠ مجم/لتر ، ويحفظ في إناء زجاجي في ثلاجة .

وللتقدير يعد منحنى قياس ، بوضع الإلكترود في سلسلة من المحاليل القياسية ، جيدة التقليب ، ويرسم المنحنى بوضع الجهد الميلليفولت mV على المحور الرأسي Vertical ضد لوغاريتم التركيزات على المحور الأفقي Horizontal Axis على ورق بياني لوغاريتمي . ضع الإلكترود في العينة ، وقلب واقرأ الجهد الكهربي وحوله إلى منحنى القياس لحساب تركيز الأمونيا .

٦ ـ النيترات في الماء :

ويتم تقديرها باستخدام إلكترود النيترات Nitrate Electrode وهو إلكترود خاص للنيترات، يماثل إلكترود الأمونيا ، فيما عدا أنه يختص بالنيترات ، فيستخدم إلكترود النيترات على جهاز PH ذي تدريج للميلليفولت mV .

وللتقدير يعد منحنى القياس ، بوضع الإلكترود في سلسلة من المحاليل القياسية (سابقة التحضير كما في الطريقة السابقة لكن باستخدام ملح نترات) ، جيدة التقليب . يوضع الإلكترود في العينة ويقرأ جهدها الكهربي على جهاز PH ، ويحسب تركيز النيترات باستخدام منحنى القياس Calibration Curve .

٧ ـ الأوكسجين الذائب Dissolved Oxygen في الماء بالإلكترود :

منذ حوالي ٣٠ سنة دخل ما يسمى بإلكترود الأوكسجين لقياس الأوكسجين الذائب في الماء . وإلكترود الأوكسجين نوعان :

الأول : جلفاني Galvnic Oxgyen Electrods ، ويتكون من قطب موجب من الرصاص Lead Anode ، وقطب سالب من الفضة Silver Cathode ، في محلول موصل للكهرباء Electrolyte ، مفصول عن المحلول المختبر بغشاء ذي نفاذية اختيارية ، فعند وجود الأوكسجين ينتج جهد كهربي Voltage يتناسب مع ضغط الأوكسجين الجزئي .

الثاني والأكثر انتشاراً هو : الاستقطابي Polarographic Oxygen Electrode ، ويستخدم فيه القطب السالب من أحد المعادن النبيلة (بلاتين ، ذهب ، تنجستين ، روديوم) ، والقطب الموجب من الفضة وكلوريد الفضة . ويمر القطبان Electrodes السالب والموجب في محلول موصل للتيار مناسب ، كمحلول منظم مشبع بكلوريد البوتاسيوم ، ويفصل هذا الالكتروليت عن محلول الاختبار بغشاء من البولي ايثيلين ، أو التفلون Teflon ، أو البولي بروبلين وغيرها . وسمك الغشاء عادة ٢٥ ميكرومتر أو أقل ، ينفذ الأوكسجين، والأيونات الصغيرة فقط . ويمر تيار معلوم القوة ثابت (يختلف من مصنع لآخر) بين القطبين

حوالي ٠,٧ فولت ، فلهذا الإلكترود جهد كهربي استقطابي ثابت ، ولوجود الأوكسچين فعل زيادة سريان التيار ، فيقوم الجهاز بقياس أي زيادة بسيطة في التيار لشدة حساسيته ، والجهاز في حد ذاته يقيس الضغط الجزئي ، لكن يحوله إلى تركيز مجم / لتر ، أو جزء في الميلون ، أو ٪ تشبع ، وربما كضغط جوي م زئبق . ويمكن تحويل هذه الوحدات من وحدة لأخرى حيث إن ٪ تشبع :

$$\% \text{ Saturation} = \frac{C_2}{C_1} \times 100$$

حيث إن C_1 عبارة عن ذائبية الأوكسچين مجم / لتر تحت ظروف المعايرة (درجة حرارة وضغط جوي) ويتحصل عليها من الجداول الخاصة بذلك بينما C_2 عبارة عن تركيز الأوكسچين الذائب مجم / لتر .

$$\therefore C_2 = \frac{\% S}{100} \times C_1$$

حيث $\%S$ عبارة عن النسبة المئوية للتشبع .

وينبغي معايرة إلكترود الأوكسچين ، بتقدير الأوكسچين الذائب في ماء مشبع الهواء ، بالتنقيط باليود ، وفي الحقل يمكن حساب الأوكسچين الذائب (D.O.) من المعادلة :

mg / l D. O. =

حيث إن P = الضغط الجوي م زئبق .

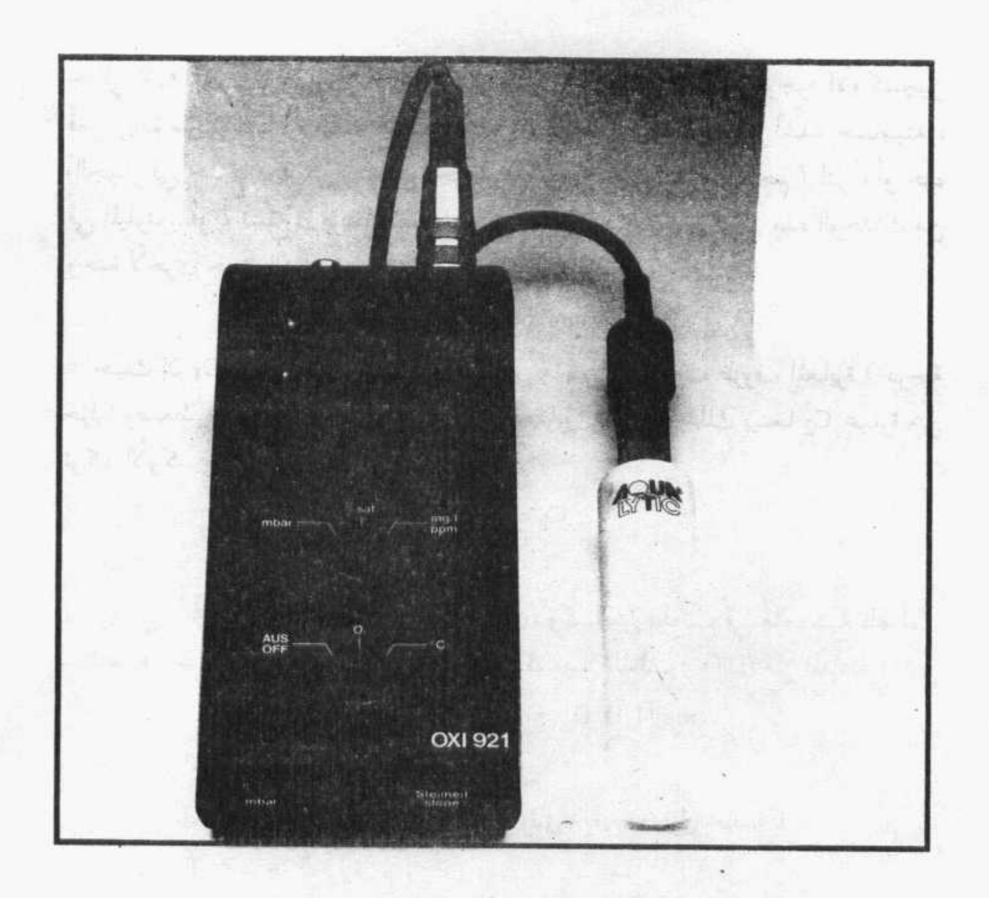
U = ضغط البخار المشبع للماء م زئبق (من جداول خاصة) .

T = درجة الحرارة ° م .

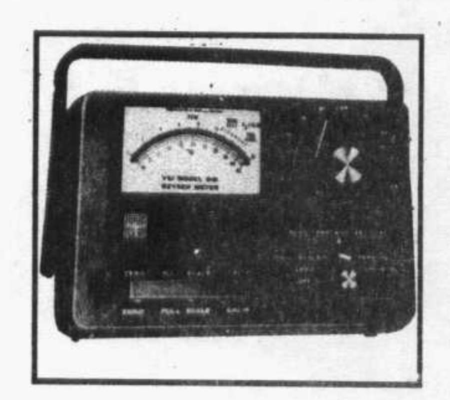
وذلك في مدى حراري من صفر إلى ٣٠° م أو باستخدام المعادلة :

mg / l D. O. =

في مدى حراري من ٣٠ إلى ٥٠° م .



جهاز إلكترود الأوكسجين (يقدر درجة
الحرارة والأوكسجين مجم / لتر و٪ تشبيع)



جهاز بسيط لقياس الأوكسجين
الذائب في الماء

كما يمكن تعيين الأوكسچين الذائب تحت ظروف الحقل (من حرارة وملوحة) من جداول معينة ، وتعدل للضغط ، بضربها في الضغط الجوي في المنطقة ، وتقسم على ٧٦٠ ؛ لأن قيم الجدول محسوبة عند ضغط جوي ٧٦٠ م زئبق . وإذا كان ضغط الباروميتر بالمليبار Mbar ، فتضرب قيم الجدول في الضغط الجوي في المنطقة بالمليبار ، وتقسم على ١٠١٠ (حيث إن ضغط ٧٦٠ م زئبق = ١,٠١ بار Bar) وبذلك يمكن معايرة إلكترود الأوكسچين ، على أن يتم ذلك في الظل تفادياً للتغييرات الحرارية الناشئة من ضوء الشمس المباشر ، ويتوفر الماء المشبع بالهواء بتقليب عينة ماء ،أو تزويدها بحجر هواء Airstone ، أو وسيلة تهوية ولو تعمل ببطارية للاستخدامات الحقلية ، على أن يزال حجر الهواء ، أو وسيلة التهوية قبل غمس الإلكترود في الماء ، مع تحاشي أي فقاعات هوائية من ملامسة غشاء الإلكترود . وفي الأجهزة التي بها صفر تدريج ، يجب معايرتها في ماء محتواه صفر أوكسچين ، باختزال الماء بمخلوط مشبع من كبريتيت صوديوم ، مع آثار من كلوريدكوبلت ، في زجاجة ضيقة العنق يظل فيها تركيز الأوكسچين الذائب صفر لمدة بسيطة .

ويتطلب الجهاز وقتاً يتراوح ما بين ٥ ثوان و ٣ دقائق للوصول من صفر أوكسچين ذائب إلى تشبع كامل ، طبقاً لنوع الجهاز ، أو للغشاء المستعمل في الإلكترود ، وإذا طال الوقت تدريجياً عما هو مقرر للجهاز فإنه يتطلب تغيير الغشاء والسائل الموصل للتيار ، مع تنظيف سطح الإلكترود . وللدقة ينبغي معايرة الإلكترود من حين لآخر ، وللحرص يفضل معايرته بعد قراءة كل عينة .

ويجب حفظ إلكترود الأوكسچين بحيث يكون غشاؤه مبتلاً دائماً بغمس الإلكترود في كأس به ماء مقطر على حرارة الغرفة ، بينما أجهزة الحقل لها أنبوبة تخزين خاصة لهذا الغرض ، تحتوي على بعض الماء بداخلها . تجنب ملامسة إلكترود الأوكسچين لأيونات الكبريتيد أو أي شحوم أو زيوت من أي نوع لأنها تضر بالجهاز .

ب ـ الكائنات المائية

١ ـ الإنتاج الأولي Primary Production للماء :

يقاس الإنتاج الأولي في النظم المائية بإنتاج الطحالب ، والذي يعد كذلك مؤشراً جيداً لإنتاج السمك ، رغم أن علاقة إنتاج السمك معقدة ، لارتباطها بإضافة الغذاء والمواد العضوية الأخرى كالأسمدة البلدية . وهذه ربما تتناولها الأسماك مباشرة ، أو تمر بالسلسلة الغذائية عن طريق تحطيم المادة العضوية Detritus Pathway ، وتغذية الكائنات الدقيقة ، فبالتالي يزيد إنتاج الأسماك المغذاة على الحيوانات الأولية Benthos .

والبناء الضوئي يشكل العملية الأساسية في الإنتاج الأولي ، والبناء الضوئي وتمثله المعادلة :

$$6\,CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{Light} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

وعليه فيقدر الإنتاج الأولي بقياس أي جزء من المعادلة السابقة ، والأسهل تقدير معدل إنتاج الأوكسجين .

وللتقدير تؤخذ عينات من الماء من ٣ أعماق مختلفة (السطح وسط العمق ومن القاع) في الفجر ، في أواني عينات زجاج ١٢٥ أو ٢٥٠ مل ، المستخدمة في جمع العينات لتقدير الأوكسجين ، على أن تكون نصف الأواني من الزجاج الشفاف الرائق والنصف الآخر مدهون بلون أسود ، أو تغطى كاملا بورق ألمونيوم . يحرص ألا تحتوي الأواني أي فقاعات هواء محبوسة . فتملأ ٣ أواني رائقة واثنان داكنة من كل عمق . يقدر تركيز الأوكسجين الأصلي في الحال في إحدى الأواني الرائقة بطريقة وينكلر ، بينما تغلق الأواني الأخرى جيداً وتربط بحبل ، وتحضن على نفس الأعماق المأخوذة منها (زجاجتان رائقتان وأخرتان داكنتان على كل عمق) . التحضير لمدة ٦-٨ ساعات خلال فترة الصباح والظهيرة ، ثم تزال وبسرعة يثبت الأوكسجين بإضافة محاليل وينكلر أ ، ب ثم يقدر الأوكسجين في المعمل بتنقيط وينكلر .

الحساب : عينات عشيرة البلانكتون النباتي المحضنة في الضوء (في الأواني الرائقة) وفي الظلام (في الأواني الداكنة) ، فالتركيز الأولي للأوكسجين الذائب (ت١) يمكن أن يتوقع له النقصان في الأواني الداكنة (ت٢) والارتفاع في الأواني الرائقة (ت٣) نتيجة نشاط البناء الضوئي عن التنفس ، وعليه :

ت١ − ت٢ = نشاط التنفس في اللتر لمدة التحضين .

ت٣ − ت١ = النشاط الصافي للتمثيل الضوئي في اللتر لمدة التحضين.

(ت١ – ت٢) + (ت٣–ت١) = النشاط الكلي للتمثيل الضوئي في اللتر لمدة التحضير (أو الكمية الكلية للأوكسجين الناتج بما فيه المستهلك في التنفس) . حيث إن ت١ ، ت٢ ، ت٣ متوسط تركيزات الأوكسجين الذائب مجم / لتر على كل عمق للتحضير للعينة المبدئية ، الأواني الداكنة ، والأواني الرائقة على الترتيب . في معظم مزارع الأسماك يكون نشاط البناء الضوئي (وعليه الإنتاج الأولي) أقصى ما يمكن على السطح .

ولحساب كمية الطاقة المثبتة لكل جرام أوكسجين خلال الإنتاج الأولي نذكر معادلة التمثيل الضوئي ثانية :

$$6\,CO_2 + 6H_2O \xrightarrow[\text{2966 KJ}]{\text{Solar Activity}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

أي أنه أثناء اشتراك ٦ مول كربون يتم تثبيت ٢٩٦٦ كيلو جول من الطاقة .كل مول كربون يزن ١٢ جراما وعليه فإن الطاقة المثبتة لكل جرام كربون مثبت = ٢٩٦٦ / (٦ × ١٢) = ٤١,٢ كيلو جول .

وعند تقدير الكربون أو الطاقة المثبتة أو الممثلة في البناء الضوئي من كمية إنتاج الأوكسجين فإنه ينبغي الأخذ في الاعتبار معدل البناء الضوئي ، وهو نسبة الأوكسجين المتكون إلى ثاني أوكسيد الكربون المستعمل (بالمول) . ومعدل التمثيل الضوئي طبقاً للمعادلة المثالية للتمثيل الضوئي يساوي واحداً ، أي أن ١٢ جم كربون تثبت (أي تدخل في البناء الضوئي) وتنتج ٣٢ جم أوكسجين (أ٢) ، إلا أنه في الواقع وجد أن هذا المعدل للبلانكتون النباتي يساوي ١,٢ ، أي أن جرام الأوكسجين الناتج يكافئ ١٢/ ٣٢ × ١,٢ = ٠,٣١٢ جرام كربون مثبت ، وعليه فإن الطاقة المثبتة لكل جرام أوكسجين (أ٢) ناتج ٠,٣١٢ × ٤١,٢ = ١٢,٨٥ كيلو جول .

وعليه فإذا حسبت نشاط البناء الضوئي الكلي والصافي في صورة مجم أ٢ لكل لتر ، فتضرب هذه الأنشطة في ٠,٣١٢ ثم ١٢,٨٥ على الترتيب للحصول على كميات الكربون المثبتة (مجم / لتر) والطاقة المثبتة (جول / لتر) .

ويتم عد العوالق النباتية بالطرد المركزي (في راشح العينة) لمدة ٥–١٠ق بسرعة ١٠٠٠٠ لفة / ق ، ويزال الرائق كلية ثم تخلط العوالق النباتية الراسية بحجم معلوم (٢سم٣ مثلاً) ، ويؤخذ من المعلق نقطة على الهيموسيتومتر Haemocytometer للفحص تحت ميكروسكوب بحثي . وعلى سبيل المثال : لو أن حجم العينة الأصلي ١٠٠ مل تم تركيزها إلى ٢ مل ، عد العوالق في ٣,٢ م٣ منها (حجم حقل الهيموسيتومتر = ٤م × ٤م × ٠,٢م) فيعطي عدد (n) من الخلايا الكلية ، بينما العدد الكلي (N) للخلايا / لتر يحسب من المعادلة :

$$N = n\ \frac{2000\ mm3}{3.2\ mm3}\ .\ 10 = n\ .\ 6250\ [\ Cells / l\ ]$$

وقد يستخدم في العد خلية عد Sedgwick - Rafter على أن تركب على العدسة العينية للميكروسكوب شبه ميكرومترية Whipple وعدسة شيئية بمسطرة ميكرومترية . وتؤخذ العينة من تحت سطح الماء بحوالي ٢٠سم في أواني بلاستك (٣-٥ لتر)، وتفحص والعوالق حية في ظرف ٢٤ ساعة على الأكثر ، وتحفظ في ثلاجة (٨-١٠°م) في الظلام لحين الفحص ، أو تحفظ بالتثبت بالفورمالين (حتى PH ٧,٨ - ٨,٢) تركيز ١,٥ ٪ (٠,٦ ٪ فورمالدهيد) أو بمحلول مكون من ٢ جم يودات بوتاسيوم + ١ جم يود في ٢٠٠ مل ماء مقطر (فيضاف منه حتى يتلون لون العينة بلون الشاي الخفيف) ، ثم ترشح العينة خلال غشاء سليلوز (أو مشتقاته) أو حرير مسامه ٠,٤٥ - ٠,٦٥ ميكرون مغطى بكربونات ماغنسيوم ناعمة (١٠مجم / سم٢) للتخلص من الصبغات والحموضة (بتعليق كربونات الماغنسيوم فى ماء مقطر (٦,٥جم / لتر ماء) ويرشح المعلق على غشاء السليلوز أولاً حتى الجفاف ، ثم يرشح العينة بعد ذلك عليه .

ويتم تقدير الكلوروفيل والكاروتينويدات في الراشح مباشرة عقب الترشيح .

ويجرى العد للعوالق النباتية في الراشح كذلك في ظرف ٢٤ ساعة على أقصى تقدير وتحفظ في هذه الفترة على ٤° م أو بالتجميد .

بينما لفحص العوالق الحيوانية الدقيقة تستخدم مرشحات ٢٠ ميكرون أو على الأقل ٤٠-٥٣ ميكرون للترشيح مباشرة عقب أخذ العينة وينقل الراشح إلى إناء به ١٩٠ مل ماء بحر + ١٠ مل فورمالين مركز (٣٨ - ٤٠ ٪ فورمالدهيد) وتضبط الحموضة إلى PH ٨-٨,٢ بالبوراكس . ويجرى العد كما سبق ذكره في العوالق النباتية .

بينما للعوالق الحيوانية المتوسطة يستخدم مرشحات ٢٠٠ ميكرون .

وتقسم الفيتو بلانكتون إلى حجمين :

١ ـ نانو بلانكتون أقل من ٢٠ ميكرون (Nanoplankton < 20U)

٢ ـ ميكرو بلانكتون ٢٠-٢٠٠ ميكرون (Phytomicroplankton 20 - 200 U)

وتنقسم الزوبلانكتون إلى ٣ أحجام :

١ ـ الماكرو بلانكتون أكبر من ٢ سم Macroplankton > 2cm

٢ ـ البلانكتون المتوسط ٠,٢-٢٠م Mesooplankton 0.2 - 20 mm

٣ ـ البلانكتون الدقيق ٢٠-٢٠٠ ميكرون Microplankton 20 - 200 U

وبشكل عملي فإن البلانكتون الكبير يعتبر الجزء من العينة المتبقي على شبكة أقطار ثقوبها ٢٥٠ ميكرون أو أكبر ، بينما البلانكتون الدقيق يتبقى على شباك دقيقة (٥٣ - ٧٠ ميكرون) .

ولفحص عينات البلانكتون النباتي :

١ ـ تؤخذ عينات الماء في أوان خاصة ، وتؤخذ أكثر من عينة عشوائياً وتخلط لعمل عينة مجمعة كبيرة ويؤخذ منها عينات للتحليل للبلانكتون النباتي والكلوروفيل والتحليل الكيماوي . (التحليلان الأخيران يجب إجراؤهما على عينات طازجة أو مجمدة لفترة قصيرة) . عينة البلانكتون النباتي بحجم على الأقل ١ لتر يمكن حفظها بإضافة الفورمالين المتعادل حتى تركيز ١,٥ - ٢٪ .

ولفحص وعدّ السوطيات العارية Naked Flagellates يجب أن يجرى في عينة طازجة لأنه غير ممكن في حالة الحفظ .

٢ ـ يجرى التحليل بالتعرف التقسيمي للأنواع الشائعة على الأقل من Diatoms, Coccolithophorids, Dinoflagellates and Naked Flagellates وبالكثافة الكلية باستخدام الميكروسكوب المحول أو الترشيح الغشائي أو بالطرد المركزي السريع .

٣ ـ تقدر المادة العضوية للبلانكتون النباتي بطريق غير مباشر بحساب حجم الخلايا على أساس النتائج المتحصل عليها سابقاً أو بالتحليل المباشر المعقد ، وللتقدير الدوري يجري تقدير الكلوروفيل .

فحص عينات البلانكتون الحيواني :

١ ـ يجرى الفحص على عينات ماء كبيرة (١٠ لتر) للبلانكتون الدقيق بالترشيح السريع في منخل ٢٠ ميكرون والحفظ في ماء بحر بفورمالين متعادل ٢٪ (٠,٨٪ فورمالدهيد) ، ويجرى التعرف والعدّ كما في البلانكتون النباتي .

٢ ـ تجمع البلانكتون المتوسط بمنخل ٢٠٠ ميكرون وتحفظ العينات في ماء بحر بفورمالين متعادل ٥٪ (٢٪ فورمالدهيد) .

٣ ـ تحليل تركيب عشيرة البلانكتون الحيواني وتقدير المجاميع النوعية يجرى بالتعرف والفرز الميكروسكوبي . وعادة يعرف البلانكتون الحيواني وتعد على مستوى الأنواع فيما عدا البلانكتون المتوسط والـ Copepods وإن كان الأخير فيه أنواع يمكن التعرف عليها وعدّها .

٤ ـ لتقدير المادة العضوية تؤخذ عينة أخرى وتحفظ بالتجميد ليجري عليها التقدير ؛ لتقدير المادة العضوية يجرى عليها كما في Bentlos .

معاملة عينات الـ Benthos :

١ ـ بعد أخذ العينة ومعظم أحيائها Biota مازالت حية تنخل في الحال في مناخل سعة ثقوبها ١-٠,٥ م بمساعدة ماء البحر لدفع النخل .

٢ ـ يتطلب استخلاص الكائنات الدقيقة Meiofauna إجراءات خاصة كالتعويم والطرد المركزي والغسيل للفصل بالإزاحة . وينقل المتبقي كمياً إلى إناء مغلق ومحفوظ بماء بحر ذو فورمالين متعادل تركيز ٥ ٪ لإجراء التحليل النوعي (تقسيمي) معملياً فيما بعد ، وإذا طالت فترة الفحص فيفضل استبدال محلول الميثانول ٧٠٪ بدلا من الفورمالدين .

٣ ـ في المعمل تفرز كل الكائنات الحية يدوياً إلى المجاميع التقسيمية لتسهيل التعرف عليها على مستوى الأنواع . وللكائنات الكبيرة Macrobenthos على الأقل يجرى تنويعها تحت ستريو ميكروسكوب .

٤ ـ يمكن تقدير المادة العضوية biomass بنفس طريقة تحديد الأنواع أو المجاميع وإن كان من الأفضل أخذ عينة أخرى واستخلاص أحيائها حية وحفظها بالتجميد. والأسلوب الموصى به هو تجفيف عينة حتى ثبات الوزن على ٧٠°م وتقدير الوزن ثم حرقها على ٥٠٠°م ويقدر وزن الرماد فيكون الفرق بين المادة الجافة والرماد هو المادة العضوية .

ولتقدير المادة العضوية : يؤخذ الماء ويرشح على ورق ترشيح عديم الرماد ثم تجفف الرواسب وورقة الترشيح على ١٠٣°م وتبرد وتوزن ثم تحرق على ٥٥٠°م لمدة ٢٠ دقيقة ثم تبرد وتوزن ، فالنقص في الوزن بالحرق هو وزن المادة العضوية ، تنسب لحجم العينة لاستنتاج المادة العضوية مجم / لتر .

٢ ـ قياسات الأسماك :

قياس الأبعاد في السمكة أو أجزائها يعتبر أكثر المقاييس استخداماً في الدراسات البيولوجية على الأسماك ، ويستخدم فيها ألواح قياس خاصة وشريط القياس Measuring Boards & Tapes وفرجار أو القدمة (مسماك) Calipers .

أ ـ قياس طول السمك : وتوزيع الأطوال في عينة السمك تعد أبسط دليل على تركيب القطيع المأخوذ منه العينة ، وهو مقياس سهل وسريع ويعتمد على أدوات بسيطة ، وله علاقة بوزن السمك قوية . ويتم قياس الطول عادة والسمكة على جانبها الأيمن (الفم على اليسار) على لوحة القياس المكونة من قاعدة خشبية أو معدنية تحمل تدريجاً في وسطها ولها حاجز طرفي رأسي الذي يضغط فم السمكة برفق تجاهه ، والفم مغلق ، وجسم السمكة وذيلها ممتد على الخط الوسطي ، وتؤخذ القراءة من التدريج . وتقاس الأطول عادة والسمكة طازجة في حالة رطبة ، وإذا بدأ التيبس الرمي Rigor mortis في السمكة فيجب أن تثني (تلين) برفق قبل القياس . وفي بعض الحالات (مثلاً أثناء تجارب الترقيم) يجب قياس الطول والسمكة حية ، وهذا يتطلب الحقن بمخدر Narcotic لجعل السمكة أسهل في التداول .

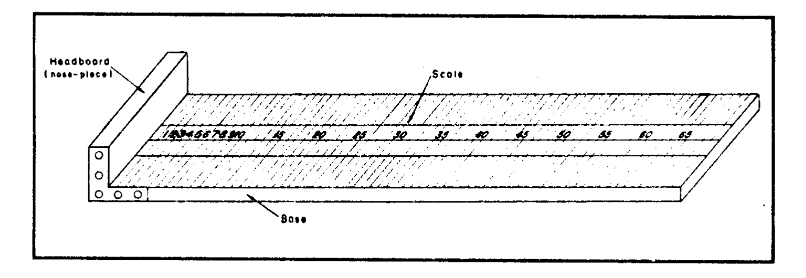
والسمك المفلطح (ظهري – بطني) كالراية يقاس وهو راقد على سطحه البطني ،

والاتجاه الخطي القياسي للراية هو عرض القرص أكثر منه طولا . والسمك الضخم الدهني قد يقاس طوله بفرجار أو بشريط قياس من نقطة إلى نقطة على طول سطح الجسم . وقد تم تطوير لوحة القياس بتزويدها بعداد يقرأ الأطوال ويسجلها فأصبحت جهاز قياس أوتوماتيك (ذاتي) أو نصف أوتوماتيك. وفي حالة تلف الزعنفة الذيلية لا يهمل قياس هذه السمكة، بل يقدر طولها الكلي بالمقارنة بسمكة أخرى بنفس الحجم تقريباً لتجنب الانحراف الناشئ من أن السمكة التالية قد تكون أضخم أو أصغر من المتوسط للعينة . وإذا كانت معظم أسماك العينة تالفة ، فيختار اتجاهاً ملائماً آخر لقياسه ويكون له معامل تحويل إلى الطول الكلي .

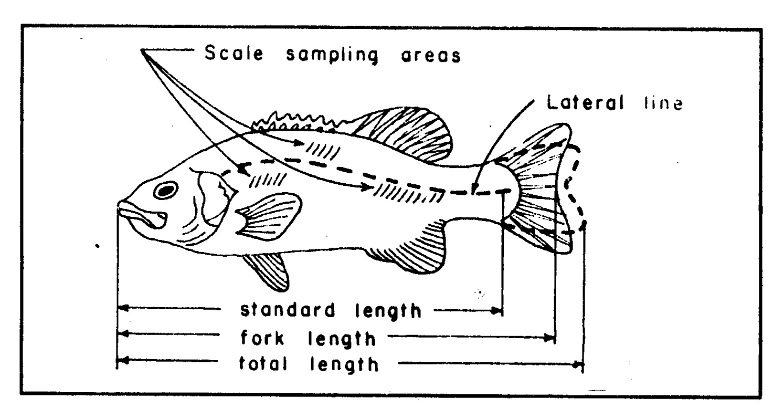
وعند تجفيف السمك فإن أثبت جزء في كثير من أنواع السمك هو الرأس ، ولما كانت هناك علاقة ما بين طول الرأس والطول الكلي ، فيمكن من طول الرأس للسمك المجفف الاستدلال على طوله الكلي باستخدام معادلات ارتداد يتم التأكد من صحتها لكل نوع في كل موسم . وقد يتطلب الاستدلال على طول جسم الأسماك المجهزة قياس كل من طول الرأس وعمقه .

وإذا كانت الأسماك أطول من ١٠سم فلا يقدر الطول لأقرب ملليمتر بل يقدر بدقة ٠,٢٥ – ٠,٥٠ سم . وفيما يلي تعاريف أطوال السمك :

الطول الكلي للجسم Over - all Length : يقاس من الفم (U موقع عظام الفك العلوي) أو من طرف الفك السفلي (L) والفم مغلق إلى حافة عظام Hypural أو إلى آخر قشرة أو نقطة الفضية أو حافة صبغة الجلد (تحدد بكشط القشور الخلفية) أو حافة الشمروخ اللحمي (S) ، ويسمى بالطول القياسي Standard Length وهو المستخدم في التقسيم العلمي ، أو إلى الحافة الغضروفية لأقصر أو أوسط شعاع للزعنفة الذيلية (F) ويسمى بالطول الشوكي Fork Length أو الحيواني أو الوسطي Median أو طول الذيل الوسطى Midcaudal وهو صعب القياس إذا كان الذيل مجزأ ، أو إلى حافة أطول أشعة الزعنفة الذيلية (N) ويسمى بالطول الكلي Total Length أو الطبيعي Normal (ظهري ، بطني، أعظم ، وسيط، متوسط) أو إلى حافة أحد فصي الزعنفة الذيلية أو حواف الفصين بعد مدها إلى المحور الطولي (X) ويعرف بالطول الكلي أو الأقصى Extreme (أعظم ، بطني،ظهري) ، أو إلى متوسط المسافة بين حافتي فصي الزعنفة الذيلية ويسمى بالطول الكلي أو الإضافي Bilobular Or Auxiliary ، أو إلى نقطة اتصال الزعنفة الذيلية بالسلسلة الظهرية (B) ويعرف بطول الجسم (الظهري) Body length (Dorsal) .

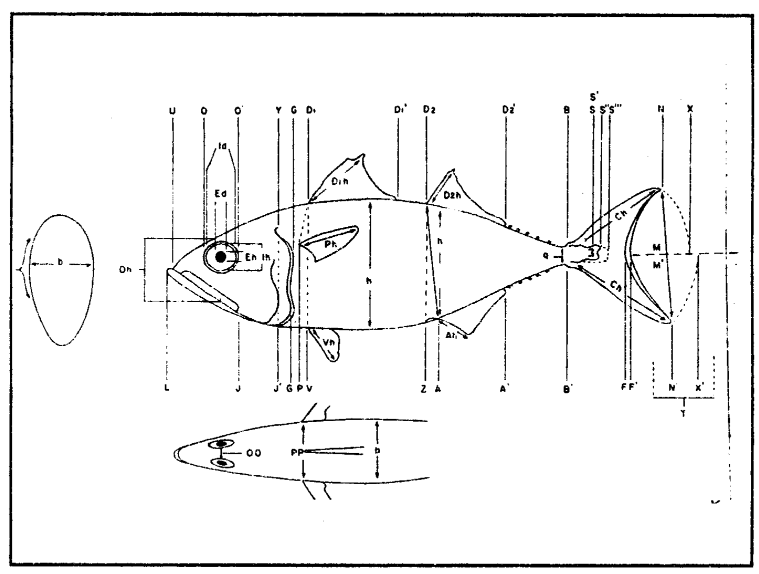


لوحة قياس Measuring Board بطول ٥٠ - ١٠٠سم وعرض ١٢سم وارتفاع الحاجز الجانبي ٥سم ودقة المقياس المرقم ١ - ٢سم ودقة الأجزاء من المقياس غير المرقمة ١ م (وقد تكفي دقة ٠,٥سم).



مقاييس السمك التقليدية ومناطق جمع القشور

(شكل ٢٩)


(شكل ٣٠) مقاييس جسم السمك

ويستخدم عمق السمك بدلاً من ارتفاعه لتفادي التداخل الحادث من ارتفاعات الزعانف ، ويقصد به الأعماق من (Oh) إلى (q) ، كذلك يستخدم اصطلاح سمك (pp) و (b) بدلا من عرض السمك .

وتعرف المسافة uy بطول الرأس العلوي Upper Head Length والمسافة LG بطول الرأس إلى الغطاء الخيشومي Opercular Head Length ، حيث Y حز غطاء الخياشيم ، G الحافة العظمية الخلفية لغطاء الخياشيم . وفي الجمبريات يعرف طول الدرقة بأقل مسافة بين داخل تجويف العين إلى الحافة الخلفية للدرع Carapace.

وعند دراسة الأنواع تؤخذ مقاييس تختلف من عائلة لأخرى ، وكلها ملاحظات وقياسات Morphological & Biometrical (Morphometry) تشمل الوزن ، الأطوال المختلفة للجسم والزعانف والفم والرأس وبين العينين ، قطر العين ، السمك والعمق وعدد الأقواس الخيشومية ، اللون ، محتوى المعدة حجما وتركيبا ، الجنس ، درجة النضج من القشور إلى غير ذلك .

ب ـ **وزن السمك الفردي** : لازم لحساب العلاقة بين الطول والوزن وعامل الحالة Condition Factor ، كذلك يستخدم الوزن للأعضاء المنفصلة ، كالمعدة والمناسل ؛ لتقدير كمية الطعام المأكول وتحديد عدد البيض ، ويستخدم لذلك ميزان القبان Steelyard والميزان

الزنبركي Spring Balance لسهولة نقلها ، وكذلك بعض الموازين المعملية البسيطة للقياسات التقريبية (لتأثرها بدرجة الحرارة والعوامل الأخرى) . ويعمل حساب لرطوبة السمك (لتحري الدقة البالغة) ولاختلافات كمية محتويات المعدة ولنمو المناسل ، لذا توزن هذه الأعضاء منفصلة . وإذا اضطر لوزن السمك المذبوح Butchered أي المجوف Eviscerated (منزوع الأحشاء أو الرأس) بعد الصيد ، فينبغي تحويله إلى وزن حي باستخدام جداول التحويل خاصة بالأنواع والأحجام المختلفة .

جـ ـ فحص المناسل في الحقل : لتحديد حالة نضج السمك ، فينفتح التجويف البطني للكشف عن المناسل وتحديد مرحلة نضجها كالتالي :

المرحلة الأولى (العذرية Virgin) : تكون فيها المناسل صغيرة جداً تحت العمود الفقري ، شفافة ، عديمة اللون إلى الرمادي ، لا ترى البيض بالعين المجردة .

المرحلة الثانية (عذراء في طور النضج Maturing Virgin) : الخصي والمبايض شبه شفافة ، حمراء ـ رمادي ، طولها نصف طول (أو أطول من النصف) التجويف البطني ، وترى بعض البيض المنفرد بعدسة مكبرة .

المرحلة الثالثة (متطورة Developing) : الخصي والمبايض غير شفافة ، حمراء بأوعية دموية ، تحتل حوالي نصف التجويف البطني ، يرى البيض بالعين كحبيبات مبيضة .

المرحلة الرابعة (تامة التطور Developed) : الخصي أبيض محمر ، لا يظهر لبن Milt بالضغط ، المبيض أحمر برتقالي ، البيض يرى بوضوح ، معتم ، الخصي والمبايض تحتل حوالي ثلثي التجويف البطني .

المرحلة الخامسة (الحمل Gravid) : الأعضاء الجنسية تملأ التجويف البطني ، الخصي أبيض ويتساقط اللبن بالضغط، البيض كامل الاستدارة وبعضه نصف شفاف وناضج .

المرحلة السادسة (الوضع Spawning) : البيض Roe واللبن Milt يسيلان بالضغط الخفيف ، معظم البيض شبه شفاف والقليل منه معتم في المبيض .

المرحلة السابعة (إنهاك Spent) : ليست فارغة تماماً ، لا يوجد في المبيض بيض معتم

المرحلة الثامنة (راحة Resting) : المناسل فارغة وحمراء ، بيض قليل في مرحلة إعادة الامتصاص .

وقد يحدث تداخل بين المرحلة ٨ ، ٢ وبين ١ ، ٢ كما يمكن ضم المرحلتين ٧ ، ٨ معاً .

د ـ عد البيض : يفرغ في مخبار لتقدير حجمة ، ثم يزاح البيض من الماء ، ويعد جزء

منه ثم يقدر حجم هذا الجزء المعدود من البيض لحساب العدد كالتالي :

$$\text{عدد البيض} = \frac{\text{حجم البيض الكلي} \times \text{عدد البيض المعدود}}{\text{حجم البيض المعدود}}$$

ولقياس قطر البيض الطازج يوضع ١٠ – ٥٠ بيضة في صف ، ويقاس طول هذا الصف ويقسم على عدد البيض فيه .

وعد البيض مهم لحساب الحيوية ولحساب عدد السمك اللازم لقطيع التفريخ ، ويجرى العد أثناء وضع البيض من الإناث بالضغط على بطنها أو بقتلها لمعرفة العدد الكلي من المبيض ، أو بنزع المبايض قبل تمام النضج . وإذا كان العدد الحقيقي من الصعب عده (كما في الأنواع غزيرة إنتاج البيض) فيجرى العد التقريبي بإحدى الطرق التالية :

١ ـ طريقة حجمية : يعد البيض في عينة معلومة الحجم ، ويقدر الحجم الكلى للبيض لاستنتاج العدد الكلى . حيث إن العدد الكلى : العدد فى العينة = الحجم الكلي : حجم العينة ، وتقدر الحجوم بالإزاحة للماء من مخبار مدرج .

٢ ـ طريقة وزنية : بوزن عينة ، ثم عد بيضها ، ثم يحدد الوزن الكلي ومنه يحسب العدد الكلي . وينبغي إزالة الرطوبة الزائدة بوضع البيض على ورق نشاف فترة زمنية ، أو بفرد البيض في طبق معرض للهواء لمدة معلومة ، وأحياناً بوضع العينة في فرن تجفيف فترة.

٣ ـ طريقة Von Bayer : وتعتمد على عد البيض في مكيال حسب قطر البيض باستخدام طاولة معدنية معلومة الطول (١٥ سم عادة) ذات تجاويف يرص فيها البيض في صفوف ليعد ، ويقاس قطر البيض بقسمة طول الطاولة على عدد البيض ، وقد تحول العدد في المكيال إلى عدد في سم^{٣} بقسمة عدد البيض على ٩٤٦,٤ (عدد السنتمترات المكعبة في المكيال) ، ومن ذلك يعرف العدد الكلي للبيض .

٤ ـ عد البيض في المبايض المحفوظة : يقاس حجم المبيض الكلي من إزاحته للماء ، يقدر حجوم ٣ قطاعات منه ، يفصل من كل قطاع البيض الناضج ويعد بعد فصله من البيض غير الناضج والأنسجة ، يؤخذ حجم البيض غير الناضج والأنسجة ويطرح من حجم القطاعات للحصول على حجم البيض الناضج ، يؤخذ متوسط النتائج الثلاثة للعد ويحسب عدد البيض تام النمو / سم^{٣} ثم للمبيض ككل . وقد يجرى العد كذلك بطريقة وزنية ، بوزن ٣ عينات من أجزاء مختلفة من المبيض ، يعد البيض كما سبق ، يحسب العدد الكلي على أساس الوزن بدلاً من الحجم .

هـ ـ فحص المعدة : يجرى فحص المعدة للسمك لدرجة امتلائها ، ودرجة هضم محتوياتها ، ونوع الغذاء بها بتوصيف الأنواع أو مجاميع الأنواع ونسب تواجدها ، ومرحلة

السمك كأن يكـون لحمياً (خالياً من آثار الدهـن في أنبوبة الهضم) أو غير دهني جداً (شرائط دهن ليست أسمك من ١ م بطول أنبوبة الهضم) أو دهني جداً (تغطى القناة الهضمية تماماً بالدهن) ، وقياسات حجمية مضبوطة لمحتوى المعدة .

بالنسبة للأنواع آكلة اللحوم ومتنوعة الأكل تزال المعدة من إناء الفورمالين ، وتوضع في ماء لمدة ٢٤ ساعة ولا تزيد عن ٤٨ ساعة ، توضع كل معدة في طبق بترى وتزال أي مادة غريبة (دهن ـ كبد ـ بنكرياس ....) افتح المعدة وأخرج محتوياتها بزجاجة غسيل واستعن بملقط لإزالة الكائنات اللاصقة ، افحص المحتويات تحت ميكرسكوب تشريح ، وافصل وتعرف وعد الكائنات الموجودة ، ضع الكائنات على نشاف دقيقة ، ضع كل مفردات أو مجاميع من المفردات في أنبوبة طرد مركزي بها ٥ مل ماء ، وسجل إزاحة الماء لمعرفة حجم كل منها ، احسب النسبة المئوية لحجم كل كائن أو مجموعه ، سجل حجم البلانكتون ، إذا كان حجم أي كائن أقل من ٠,١ سم^{٣} ، فيشار إليه على أنه آثار ، السمك الموجود في المعدة يتم تعريفه وقياسه لأقرب م إذا كان سليماً ، يعمل جدول لكل معدة حتى ولو كانت خالية .

وبالنسبة للأنواع آكلة العشب تزال من الفورمالين وتنقع في ماء ٢٤ ساعة ثم تفرغ في طبق بتري ، يحصل على عينة من معظم الجزء الأمامي للأمعاء وتوضع في أنبوبة طرد مركزي مع تقليبها بإبرة لإزالة أي فقاعات هوائية ، خفف بنسبة ١ :٥ وقلب ورج ، خذ ١ مل في خلية Sedgwick Rafter لعد الكائنات ثم اضرب في التخفيف لتسجيل العدد الكلي، إذا وجدت طحالب كبيرة أو مواد نباتية يحدد نسبتها الحجمية ، المكونات الأخرى التي يمكن عدها يعبر عنها كنسبة مئوية للأعداد ، محتويات المعدة قد يتعرف عليها أو لا يتعرف عليها .

هذا وتحسب نسبة السمك الذي يحتوي على مكون غذائي معين أو سائد ، ويعبر عن حجم أو وزن كل غـذاء في كل سمكـة كنسبة من وزن السمكـة ، ويعين دليل الغـذاء (حجم محتويات المعدة بالإزاحة × ١٠^{٥} / (طول الجسم)^{٣}) .

و ـ **تحديد العمر** : من أهم تحاليل السمك ، وله كثير من الاستخدامات . وأحد أبسط الطرق ؛ لكن أقل دقة هو بتقدير توزيع تكرار الطول ، ولكنها لا تطبق على السمك الكبير السن أو الصغير السن . والطرق الأخرى تستخدم حجر الأذن ، الأشواك ، الدعامات، الفقرات ، القشور والتي عادة (وليس دائماً) تحتوي حلقات سنوية مميزة .

وتستخدم عادة القشور الجافة ، فتنقع أولاً وتنظف مما يلصق بها من دهن ومخاط ، فتعطن عدة أيام في حجم بسيط من الماء ثم تغسل بالبوتاسا الكاوية ٥٪ ، وتوضع عدة قشور من نفس السمكة على شريحة واحدة . تعد الأشعة السنوية الحقيقية . كما تستخدم

القشور كذلك للحساب الرجعي لطول السمك في الأعمار المختلفة لجودة العلاقة بين مقاييس القشرة ونمو السمك ، والتي توقع على منحنيات تختلف باختلاف الأنواع . وتقاس القشور على جهاز عرض خاص باستخدام جهاز عرض شرائح بسيط أو باستخدم جهاز تصوير ميكروسكوب .

وإذا لم يمكن تقدير العمر من الأجزاء العظمية ، فيمكن تقديره من منحنيات تكرار الحجم .

ز ـ ملاحظات المرض والنفوق : كل الأسماك التي تظهر أعراضاً مرضية يجب حفظها لدراستها معملياً خاصة عند حدوث نفوق غير طبيعي . ويجب الفحص الحقلي أولاً للون الماء ، وحركة السمك وسلوكه ، ولون الخياشيم ، وفتح الفم ووجود طفيليات ، وجود طحالب أو طين على الخياشيم، لون السمك ، التلف الخارجي على جسم السمك، تلون وتشويه الكبد والمعدة . وفي النفوق الجماعي تسجل حركة الرياح والتيارات وقت النفوق وقبله بأيام ، وتؤخذ عينات ماء للتحليل (تحفظ بعضها بحمض الهيدروكلوريك ٧,٥ مل ١٢ عياري / لتر ويحفظ بعضها الآخر بالفورمالين حتى تركيز ٢٪ فورمالين في العينة) من أعماق مختلفة ومواقع مختلفة حيث السمك النافق ، كما تجمع عينات بلانكتون .

وفحص الطفيليات هام جداً خاصة في أنواع السمك للماء العذب ، فيتعرف على طفيليات كل نوع ، ولذلك تحفظ عينات السمك بعد قتلها فتثبت في محلول Bouin ثم تحفظ في كحول ٧٠٪ لفحصها خارجياً وداخلياً ، مع وضع بيانات العينات مع العينات في محلول الحفظ ؛ لذا تكتب برصاص لا يمحى على كتان أو تيل .

جـ ـ التربـة

من العوامل الواجب دراستها في التربة التي سيقام عليها مزرعة سمكية :

١ ــ القوام والمسامية والطبوغرافية .

٢ ــ معدل تسرب المياه والنفاذية .

٣ ــ حموضة وقلوية .

٤ ــ العناصر الغذائية .

فالقوام : يقصد به نسب أحجام الرمل والسلت والطين ، أي يعبر بالقوام عن درجة خشونة أو نعومة التربة ، فالتربة الرملية الخفيفة ذات قوام خشن ، بينما التربة الثقيلة الغنية بالسلت والطين يكون قوامها ناعماً ، وتحتفظ بالماء عن تلك الرملية ، فالقوام يدل على قدرة الاحتفاظ بالماء والمحتوى من العناصر الغذائية . ويحدد القوام باللمس أوبالهيدروميتر أو بالماصة أو بالغرابيل (مناخل) .

أما المسامية : فتدل على نسبة الفراغ المشغول بالماء أو الهواء أو كليهما ، وتحسب المسامية بمعلومية كثافة التربة أو الحجم (الحقيقي والظاهري) .

ومعدل التسرب : أو سرعة تخلل الماء لسطح الأرض فتقدر بواسطة عمل أحواض أو اسطوانات ، ورفع منسوب الماء بها وقياس معدل التسرب على فترات .

وتركيز أيون هيدروجين التربة : من الأهمية بمكان ، إذ يؤثر على ذائبية العناصر وتفاعلات التربة ، ويقدر بالأدلة أو كهربياً في مستخلص التربة .

وبقياس التوصيل الكهربي للتربة يمكن تقدير تركيز الأملاح في معلق التربة .

وفي الحقل قد يتطلب الأمر إجراء اختبار سريع لصلاحية تربة موقع ما لإنشاء مزرعة سمكية ، وذلك لاختبار قدرة التربة للاحتفاظ بالماء قبل الشروع في أخذ عينة ونقلها للتحاليل المعملية ، ويتم ذلك بأخذ قبضة يد من التربة السطحية وكذا من ناتج حفر على عمق مساو لارتفاع ركبة الإنسان ، والضغط على هذه القبضة باليد وقذفها لأعلى ثم التقاطها ، فإن ظلت كتلة التربة متماسكة دل ذلك على قدرتها للاحتفاظ بالماء ، وبالتالي لإقامة المزرعة السمكية عليها (إذا توافرت المتطلبات الأخرى) .

التحليل الميكانيكي للتربة :

يقصد به تحديد قوام الأرض أي تقدير النسب المئوية لمجاميع الحبيبات وترجع أهميته في أنه :

- يمكن من معرفة السطح النوعي للتربة .
- يمكن عن طريقه تحديد أماكن الترع والمصارف والميول .
- يمكن عن طريقه تحديد مدى إقامة الجسور .
- يمكن عن طريقه معرفة حركة المياه وقدرتها على احتفاظها بالماء .

تنحصر عملية التحليل الميكانيكي في خطوتين :
- تفرقة الحبيبات الأرضية .
- فصل وتقدير المجموعات المختلفة .

طرق تفريق الحبيبات الأرضية :

ميكانيكية :

- الرج : باليد أو جهاز رج ميكانيكي .
- التقليب : أكثر كفاءة من الرج ويستخدم الخلاط ١٠-٢٠ دقيقة .
- الغليان : لمدة ساعة = التقليب لمدة ٦ ساعات .
- الدعك : يستعمل يد هون كاوتشوك .

كيميائية :

تتلخص في التخلص من المواد اللاحمة (معدنية - عضوية) ، ثم إزالة الكاتيونات المجمعة واستبدالها بأخرى تعمل على تفريق الحبيبات .

١ - التخلص من المواد اللاحمة :

أ - تفصل المادة العضوية عن طريق هضمها بواسطة فوق أوكسيد الهيدروچين ٦ ٪ بالوزن والغليان في حمام مائي حتى انتهاء التفاعل (الفوران) .

ب - أما أكسيد الحديد ، الألومنيوم الحرة المتأنية فتفصل باختزانها بواسطة حمض الكبريتيك وكبريتور الصوديوم .

جـ - كربونات الكالسيوم تعمل علي تجميع الحبيبات عن طريق كاتيونات الكالسيوم ويتخلص منها بإضافة يدكل .

٢ - عن طريق إعادة ماء التأدرت الذي يغلف المركبات العروية ، وإعادة ماء الانتفاخ الذي يفقد عند الجفاف مما يؤدي إلى زيادة قوى التجاذب بين حبيبات التربة وبعضها .

٣ - إزالة الأيونات المجمعة واستبدالها بغيرها مفرقة خاصة المدمصة منها بقوة مثل الكالسيوم والماغنسيوم فهي تزال عن طريق :

أ - نسلها بالأحماض المخففة ثم إضافة المادة المفرقة .

ب - ترسيبها على صورة غير ذائبة .

طرق التحليل الميكانيكي :

يوجد طريقتان (تقسيمتان) لمجموعات حبيبات التربة :

١ ـ التقسيم الدولي .	٢ ـ التقسيم الأمريكي .
٢ – ٢,٠ م رمل خشن	٢ – ١ م حصى
٢,٠ – ٠٢,٠ رمل ناعم	١ – ٥,٠ م رمل خشن
٠٢, – ٠٠٢, سلت	٥, – ٢٥, رمل متوسط
٠٠٢,٠ فأقل طين	٢٥, – ١, رمل ناعم
	١, – ٠٥, رمال ناعم جداً
	٠٥, – ٠٠٢, سلت
	٠٠٢, فأقل طين

وطرق التحليل الميكانيكي إما :

١ ـ طريقة الغرابيل .
٢ ـ طريقة مخبار اتريرج .
٣ ـ طريقة الماصة .
٤ ـ طريقة الهيدرومتر .

١ ـ طريقة الغرابيل :

تعتمد على وجود مجموعة مناخل ذات أقطار مختلفة يتم فيها فصل مجموعة الحبيبات ذات القطر الأكبر من حجم معلوم ثم الأصغر منه حجماً .

وقد وجد بأنه يمكن فصل الحبيبات حتى حجم ٠٥, م أي الرمل الناعم جداً باستعمال غربال به ٣٠٠ ثقب في بوصة المربعة .

ويستعمل عادة غربال ثقوبه ٢م لفصل ناعم التربة عن الحصى والزلط ثم منخل ٢,م لفصل الرمل الخشن .

هذه لا تتطلب إلا في حالة الحبيبات الكبيرة ومن عيوبها اتساع عيون المناخل بجانب أنها تعتبر أن حبيبات التربة مستديرة .

٢ ـ طريقة مخبار اتريرج .

٣ ـ طريقة الماصة :

الأساس الذي بنيت عليه هو تقدير كثافة المعلق عند عمق معلوم بتأثير الزمن ويقاس هذا التغيير في الكثافة بأخذ حجم معلوم من المعلق (المتجانس) عند عمق ثابت (١سم مادة)وعند مرور زمن الترسيب المحسوب من المعادلة .

ثم تجفف هذه العينة على حمام مائي ثم فرن كهربي على درجة ١٠٥–١١٠°م لمدة

ليلة ويحسب وزنها الجاف تماماً ومنها يمكن حساب نسبتها المئوية في العينة مع ملاحظة أن ما يقدر هو ما بقي عالقاً عند العمق المعلوم بعد الترسيب ويجب مراعاة ما يلي :

- ثبات درجة الحرارة طوال التجربة .
- أخذ العينة بسرعة مناسبة قبل مرور زمن الترسيب بعشر ثوان .
- لا يزيد تركيز المعلق من الحبيبات الأرضية عن ٢ ٪ .

طريقة العمل :

١ ـ تؤخذ وزنة في حدود ٢٠جم من ناعم التربة وتوزن هوائياً وبمعلومية نسبة الرطوبة في الأرض تحول إلى وزن جاف تماماً .

٢ ـ توضع العينة في كأس ٥٠٠ سم٣ ثم يوضع حوالي ٦٠ سم٣ يد٢ أ٢ ٦ ٪ بالوزن على فترات مع دوام التقليب ثم توضع في حمام مائي حتى انتهاء التوازن ثم تترك ليلة ثم يختبر لتمام التأكد من التخلص من المادة العضوية بإضافة ١ سم٣ يد٢ أ٢ .

٣ ـ يضاف حوالي ٥٠ سم٣ حمض يدكل المخفف مع التقليب حتى انتهاء الفوران والانتظار لمدة ٤ ساعات أوليلة حتى تتحول كل الأملاح إلى كلوريدات سهلة الذوبان في الماء .

٤ ـ تنقل العينة نقل كمي من الكأس إلى دورق الرج عليه ورقة ترشيح ثم يوضع الدورق على جهاز الرج بعد إضافة ٥ سم٣ من المادة المفرقة (٥ سم٣ أيدروكسيد الأمونيوم المركزة) ويترك الدورق في الجهاز لمدة ١٠-١٢ ساعة لزيادة عملية التفريق .

٥ ـ ينقل الدورق من جهاز الرج إلى مخبار ترشيح مع غسيل الدورق غسيلاً جيداً على منخل قطر ٠,٢م ثم دعك المنخل وذلك لفصل الرمل الخشن وتجفيفة ووزنه ثم حساب نسبته المئوية في العينة .

١ـ $\text{٪ الرمل الخشن} = \frac{\text{وزن الرمل الخشن الجاف (من على المنخل)}}{\text{وزن العينة جافة تماماً}} \times ١٠٠$

٦ ـ يكمل مخبار الترسيب إلى اللتر بماء مقطر رجة لمدة دقيقة للحصول على معلق متجانس وبمعرفة درجة حرارة المعمل وزمن الترسيب للحبيبات (سلت ، طين) يؤخذ بماصة بها علامة بارتفاع ١٠سم تنزل حتى العلامة داخل المخبار وتسحب العينة ثم توضع فى جفنة على حمام مائي ثم تجفف وتوزن وتحسب نسبتها المئوية كالآتي :

٢ـ $\frac{١}{٢}\text{السلت + الطين} = \frac{\text{وزن العينة « المسحوب بالماصة »}}{\text{وزن العينة جافة تماماً}} \times \frac{١٠٠٠}{\text{حجم الماصة}} \times ١٠٠$

٧ ـ بعد مرور الزمن اللازم لترسيب حبيبات السلت يؤخذ حجم الماصة ثم يوضع في جفنة ويجفف ويوزن ومنه يحسب نسبة الطين .

٣ـ ٪ الطين فقط = وزن العينة بعد تجفيفها × $\frac{١٠٠٠}{\text{حجم الماصة}}$ × $\frac{١٠٠}{\text{وزن العينة جافة تمام}}$

من ٢ ، ٣ يمكن حساب السلت ٪ .

٨ ـ يفصل الرمل الناعم بالسكب والترويق في كاسات سعة ٥٠٠سم^{3} على أن يكون المعلق فيها ١٠سم وبعد أن يصبح المعلق رائقاً تماماً تحسب النسبة المئوية للرمل الناعم .

٩ ـ بعد تدوين النتائج المتحصل عليها يمكن تحديد قوام التربة وذلك عن طريق مثلث القوام مع ملاحظة أنه يجب تعديد النسب كلها بحيث تصل إلى ١٠٠ ٪ قبل التوقيع على مثلث القوام .

٤ ـ طريقة الهيدرومتر :

هي مبنية على أساس سقوط الحبيبات تحت تأثير الجاذبية الأرضية وتقاس كثافة المعلق بواسطة الهيدرومتر في أوقات معينة أثناء الترسيب .

طريقة العمل :

ـ يوزن بالضبط حوالي ٥٠جم أرض جافة تماماً ، والمارة من خلال منخل قطر ثقوبه ٢م وذلك في حالة التربة الناعمة .

ـ أما إذا كانت التربة خشنة القوام يؤخذ ما يوازي ١٠٠جم تربة جافة .

ـ توضع في إناء التفريق ثم يضاف ماء مقطر بحيث تغطي السطح بمقدار ٢,٥ بوصة ، وبعد ذلك يضاف ٥سم^{3} من المادة المفرقة (محلول أكسالات الصوديوم العيارية) .

يوضع الإناء في جهاز التفريق (التقليب) لمدة ٥–١٥ دقيقة على حسب قوام التربة حتى تمام التفريق .

ـ ينقل المعلق إلى مخبار مدرج ويكمل حتى لتر ويقلب حتى يصبح متجانسا .

ـ قبل مرور الوقت المحدد لأخذ القراءة الأولى بحوالي ١٥ ثانية يوضع الهيدرومتر ، وعند الزمن بالضبط تسجل قراءة الهيدرومتر ويخرج بهدوء .

ـ ينظف الهيدرومتر جيداً وقبل مرور الزمن اللازم لسقوط الحبيبات ذات الأقطار ٠٠٥,م فأقل بحوالي ١٥ ثانية يوضع في المعلق وتسجل قراءته وتحسب النتائج كالآتي :

٪ للحبيبات ذات الأقطار ٠٥, فأقل = (قراءة الهيدرومتر بعد ٦٠ ثانية / وزن العينة جافة تماماً) × ١٠٠
٪ للحبيبات ذات الأقطار ٠٠٥, فأقل = (قراءة الهيدرومتر بعد ساعة / وزن العينة جافة تماماً) × ١٠٠
٪ للحبيبات ذات الأقطار (من ٠٥, – ٠٠٥,) = الفرق بين النسبتين

ملاحظات :

– الهيدرومتر مدرج على أساس كثافة حبيبات المعلق ٢,٦٥م / سم٣ وأن وسط الانتشار هو الماء المقطر عند درجة حرارة ١٩,٤ْم لذلك يجب تعديل قراءة الهيدرومتر بإضافة ± ٤,م من أقسام الهيدرومتر لكل درجة حرارة زيادة أو نقص عن ١٩,٤ْم .

– يمكن تحديد قوام التربة بعد تحديد النسب المئوية للمجاميع المختلفة (رمل – سلت – طين) وذلك بتوقيع النتائج على مثلث القوام لتحديد رتبة الأرض بالضبط .

حيث إن تقاطع (أو المثلث الناتج من تقاطع) النسب الثلاثة المختلفة هي تمثل رتبة الأرض المجهولة تحت الاختبار .

الكثافة الظاهرية للأرض :

هي النسبة بين كتلة معينة من الأرض إلى حجم حبيبات الأرض نفسها والمسام الموجود بها (أي الحجم الظاهري) ، والكثافة الظاهرية لأرضٍ ما أقل دائماً من كثافتها الحقيقية .

العوامل التي تتوقف عليها الكثافة الظاهرية :

١ – نظام تجاور الحبيبات للأراضي المفككة والمحتوية على حيز مسامي كبير تكون كثافتها أقل من تلك المندمجة والتي تحتوي على حيز مسامي قليل نسبياً .

٢ – درجة تحبب الأرض كلما كانت الأرض محببة كانت الكثافة الظاهرية منخفضة .

أهمية الكثافة الظاهرية :

– دليل على مسامية الأرض ، فكلما كانت الكثافة الظاهرية صغيرة كانت مسامية الأرض كبيرة .

– إذا كانت الكثافة الظاهرية كبيرة دل ذلك على أن الأرض مندمجة ومساميتها قليلة .

– بزيادة الكثافة الظاهرية يزداد احتفاظ الأرض بالمياه .

الكثافة الظاهرية للأرض بين ١,١ – ١,٣ في الطينية

١,٥ – ١,٧ في الرملية

تقدير معامل البناء :

١ ـ يؤخذ عينة وزنها ٢٠جم جافة هوائياً والتي سبق أن نخلت بمنخل ٢م وتوضع في كأس سعة ٦٠٠سم^{٣} .

٢ ـ تغسل العينة ٥ – ٨ مرات بالماء المقطر حتى تمام التخلص من الأملاح الذائبة، ويمكن معرفة ذلك بالكشف عن الكلوريد .

ـ انقل العينة إلى زجاجة رج سعة ٥٠٠سم^{٣} أو ١٠٠٠سم^{٣} وأكمل إلى ٢٥٠سم^{٣} أو ٥٠٠سم^{٣} على الترتيب بالماء المقطر .

ـ رج العينة في جهاز رج قلاب لمدة ١٢ ساعة لسرعة ٤٠ لفة / دقيقة .

ـ بعد الرج تنقل العينة إلى مخبار الرج ، وتفصل المكونات : الرمل الخشن والناعم والسلت والطين .

ويحسب معامل البناء من المعادلة التالية :

$$\text{معامل البناء} = \frac{\text{نسبة الطين بعد التفرقة} - \text{نسبته بدون تفرقة}}{\text{نسبة الطين بعد التفرقة}} \times ١٠٠$$

المسامية :

وهي عبارة عن الجزء المشغول بالماء والهواء من التربة .

$$\text{٪ المسامية} = \frac{\text{الحجم الظاهري} - \text{الحجم الحقيقي}}{\text{الحجم الظاهري}} \times ١٠٠$$

فهي للأراضي الرملية ٣٥ – ٥٠٪ وفي الأراضي الطينية ٢٠ – ٣٠٪ .

العومل التي تؤثر على احتفاظ التربة بالمياه وخروجه منها :

- درجة الحرارة .
- الضغط الكلي .
- كمية ونوع الغرويات الأرضية .
- نوع الكاتيونات المدمصة أو المتبادلة على سطح غروي .
- الكثافة الظاهرية .
- البناء الأرضي ونوع التجمعات الأرضية وكميتها .
- وجود الطبقات في القطاع .
- وجود الأملاح .

مراجع يمكن الرجوع إليها فى هذا الشأن :

– فتحى إبراهيم مسعود (١٩٦٣) : أساسيات الرى الزراعى – دار المطبوعات الجديدة الأسكندرية .

– كاظم مشجوت عواد (١٩٨٦) : مبادئ كيمياء التربة – جامعة الموصل .

– محمود إبراهيم فهمى (وآخرون) : تجارب عملية فى أساسيات علم الأرض – دار المعارف بمصر (١٩٦٥) .

ـ نور طاهر الطيب ، بشير محمود جرار (١٩٨٨) : قياس التلوث البيئى ـ دار المريخ للنشر – الرياض .

- Laevastu, T. (1965) FAO Manuals in Fisheries Science No. 1 Fascicule 1 & 9, FAO , Rome .

- Ranganna , S. (1979) Manual of analysis of fruit and vegetable products , Tata Mc Graw - Hill , New Delhi .

- Stirling , H. P . (1985) Chemical and biological methods of water anlysis for aquaculturalists . Inst. of Aquaculture, Univ . Stirling, Scotland .

- Woyewoda, A. D. et al (1986) Can. Tech. Rep. Fish & Aquatic Sci. No 1448 .

الفصل الثالث

اللحـــــوم

صدر قرار وزير الصحة رقم ٨ لسنة ١٩٩٠ بتحديد الألوان الصناعية والطبيعية المسموح بإضافتها إلى الأغذية مع إيضاح اسمها وتركيبها ورقمها في دليل الألوان وذلك في جدولين مرفقين بالقرار . كما صدر قرار وزير الصحة رقم ٣٨١ لسنة ١٩٨٢ بشأن المواد المسموح بإضافة مواد ملونة إليها .

١ ـ تقدير اللون Colour Measurement :

ويقدر اللون في مستخلص للعينة ، ففي اللحوم تستخلص عينة في إيثانول ٥٠ ٪ محتوى على ٤ ٪ أمونيا لمدة نصف ساعة ، والترشيح والتركيز ، ثم التحميض بحوالي ١ ٪ حمض كبريتيك ، ثم الاستخلاص بالبيوتانول العادي .

بينما السمك يستخلص في ٥٠ ٪ أسيتون محتوى على ٠,٥ مل أمونيا لمدة ١٠ دقائق ، اطرد مركزياً ثم بخر الطبقة المائية ، واستخلص الدهن بالإيثير . أذب في ٢٥ مل حمض كبريتيك ١ ٪ ، ثم استخلص بالبيوتانول العادي .

المواد الكربوهيدراتية تستخلص في ماء ثم يضاف إليها ٨ مل حمض كبريتيك ٢٥ ٪ لكل ١٠٠ مل محلول ، ثم استخلص بالبيوتانول العادي (في حالة عدم وجود دهون ، أما إذا احتوت العينة على الدهن فتستخلص أولا في ماء مع جعله قلوياً ، ثم الترشيح وإضافة ٨مل حمض كبريتيك ٢٥ ٪ لكل ١٠٠ مل مستخلص، ثم استخلص بالبيوتانول العادي) .

قس الكثافة الضوئية ضد بيوتانول عادى على ٤٢٠ ، ٧٢٠ نانومتر .

$$\text{دليل اللون} = ١٠٠ \times \frac{\text{القراءة عند ٤٢٠ نانومتر} - ٢\ (\text{القراءة عند ٧٢٠ نانومتر})}{\text{طول خلية الجهاز} \times \text{التركيز}}$$

وعبر عن اللون بالأحمر أو الأصفر أو الأزرق وغيرها حسب دليل اللون .

دليل اللون	اللـــــون
٤٧٠٠٥	كينولين – أصفر
١٣٠١٥	أصفر ثابت
٦٩٨٠٠	أزرق
٤٢٠٩٠	أزرق فاتح
٤٢٦٤٠	بنفسجي

وقد يقاس لون اللحوم باستخدام أقراص منسل Munsel Color Discks ، أو اللوحات اللونية Color Charts لمقارنة الألوان ، أو يستخدم جهاز Photovolt Reflectometer ، وغير ذلك من الأجهزة المستخدمة في هذا المجال .

٢ ـ تقدير درجة تركيز أيون الهيدروچين PH :

وذلك باستخدام مقياس الحموضة PH - Meter لتقدير التغييرات الطارئة على حموضة اللحم بغمس الكترود خاص في العضلات . كما قد يقدر PH اللحوم باستخدام ورق دليل خاص .

وتتراوح في السمك الحي ما بين ٦,٧ — ٧,٠ ، وتتوقف قيمتها على الوقت من السنة ، التغذية ، النشاط . وبعد الموت يتحلل الجليكوچين إلى حمض لاكتيك وتزداد الحموضة طبقاً لمحتوى العضلات من الجليكوچين وقت موت السمك ، وكذلك طبقاً لعنف التداول ودرجة حرارة التخزين .

فعند استنزاف مخزون الجسم لنقص الغذاء وزيادة احتياجات الطاقة لنمو أعضاء الجنس في نهاية الشتاء والربيع ، يزداد المحتوى المائي وينخفض الجليكوچين في عضلات السمك ، بينما السمك غير الناضج لا يخضع لهذه التغييرات ، وبعد وضع البيض تتغذى الأسماك بشدة فيزداد محتوى الجليكوچين بشدة في العضلات ، وفي هذه الحالة الأخيرة وبعد موت السمك وفي حالة التيبس الرمى Rigor Mortis تنخفض قيمة PH عضلات السمك بسرعة للحد الأدني (غالباً أقل من ٦) مسبباً قصر العضلات .

وعموماً فإن الأسماك بعد فترة قصيرة من شدة التغذية ، تبدأ في اختيار غذائها فيعود مستوى جليكوچين العضلات إلى الحدود الطبيعية .

وبعد مرحلة التيبس الرمى يبدأ الفعل البكتيري منتجاً أمونيا وقواعد أخرى فترتفع قيم PH السمك فقيم PH أعلى من ٧ تشير إلى تلف السمك .

وتقدر قيم PH السمك إما في مفروم العضلات أو مستخلصها المائي مباشرة عقب الفرم أو الاستخلاص ، باستخدام إلكترود زجاج .

٣ ـ اللحوم الشاحبة المائية :

لتشخيص اللحوم الشاحبة المائية PSE من المهم جداً تقدير تركيز أيون الهيدروچين في أول ساعة بعد الذبح PH_1 ، فإذا كانت مساوية أو أقل من ٥,٦ كانت مصابة ، وإن كانت أقل من أو مساوية ٥,٨ كان هناك شك ، وإن كانت أعلى من ٥,٨ لم تكن مصابة ، إذ إن PH_1 عبارة عن مقياس أساسي مرتبط بالعمليات البيوكيماوية في العضلات .

قدرة الاحتفاظ بالماء كذلك مقياس أساسي مرتبط بجودة اللحم خاصة بالخواص التركيبية (القوام) ، فيمكن استغلاله للحكم على اللحوم المصابة أو غير المصابة بمرض

. PSE

وثالث وسيلة للتشخيص هي قياس درجة حرارة عمق الفخذ ، ولا يعتمد عليها منفردة بل مع أي من القياسين الأولين أو كلاهما .

وهناك من الأجهزة الحديثة (MS tester) ما يستخدم على سير الذبح لتقدير هذه المقاييس الثلاثة السابقة ويعبر عنها حسابياً لتشخيص اللحم المصاب (PSE) من غير المصاب.

٤ـ القوام Texture :

تقاس قوام أو تركيب اللحوم ومنتجاتها باستخدام جهاز الاختراق Penetrometer الذي فيه تتناسب المسافة التي يخترقها في العينة عكسياً مع تركيب أو قوام العينة ، بينما تتناسب قوة الاختراق مع تركيب العينة طردياً . وفيه يستخدم جهاز قياس مسافة الاختراق Dis-tance Penertrometer الذي ينصب رأسياً وتوضع العينة (في شكل شرائح لا يقل سمكها عن ٤ سم حتى لا تخترقها الإبرة إلى حامل العينة فتتلف الإبرة) على حامل العينة على لوح زجاجي ، وتختار رأس الاختراق أو الإبرة (التي تختلف أشكالها وأوزانها) التي تتصل بحبل يسقطها على العينة ، والحبل متصل بضابط ارتفاع ومقياس للمسافة ، وتشير لمبة إضاءة إلى اتصال الإبرة بالعينة . ولا يتطلب القياس أكثر من ٥ ثوان . ويقاس قوام سجق الفرانكفورت على درجة حرارة ٥ْم بثقل ٣٤٨ أو ٥٤٨ جم بإبرة اختراق ٢,٥جم وحبل ٤٧,٥ جم . بينما يقاس قوام السجق الجاف بإبرة مخروطية تحت ثقل ١٠٠,٥جم على درجة حرارة ٢٠ْم ، أما اللحوم الطازجة أو المطبوخة فيقدر قوامها بإبرة ٢,٥جم تحت وزن اختراق ٥٠ جم للحم الخام أو ٣٠٠ جم للحم المطبوخ بزمن اختراق ٢ ثانى

يمكن تقدير قوام (تركيب) اللحوم من تركيبها الكيماوي من المعادلات :

$$\text{Feder Value} = \frac{\text{٪ للماء}}{\text{١٠٠} - (\text{٪ للدهن} + \text{٪ للماء} + \text{٪ للرماد})}$$

$$\text{معامل البروتين / ماء} = \frac{\text{٪ للبروتين}}{\text{٪ للماء}}$$

$$\text{معامل البروتين / ماء ودهن} = \frac{\text{٪ للبروتين}}{\text{٪ للماء} + \text{٪ للدهن}}$$

ومن تقدير ليونة اللحم بالمضغ للحوم المسلوقة ، أو بالأجهزة الخاصة ، فتقاس مطاطية اللحم بجهاز Kymograph ، بينما تقاس صلابة اللحم بجهاز Sclerometer . وتقدر قدرة

الاحتفاظ للحوم بمائها بقطع وسط عينة لحم جافة بسكين حاد لقطعة تزن ٢ جم تقريباً ، ويقدر وزنها بالضبط ، ثم تضغط بواسطة جهاز الضغط (أو صنجة ٥ كجم مثلا بين ورقتي ترشيح بين لوحي زجاج) لمدة ١٠ دقائق ، ثم يحدد مساحة العصير الخارج من العينة بالبلانيميتر ، وتوزن العينة ثانية بعد العصر وتقدر نسبة الرطوبة في العينة الأولية ، وتقدر نسبة قدرة حفظ العصير أو الاحتفاظ بالماء Water Holding Capacity (WHC)

$$= \frac{\text{وزن العينة بعد العصر}}{\text{وزن العينة قبل العصر}} \times ١٠٠$$

$$\text{أو} = \frac{(\text{٪ للرطوبة} \times \text{وزن العينة مجم}) - ٨,٤ \ (\text{مساحة العصير سم}^{٢})}{\text{وزن العينة مجم}} \times ١٠٠$$

وذلك لمعرفة خواص اللحوم الطبيعية .

هذا وتتأثر قوة الارتباط بالماء هذه بعملية تكسير الروابط الببتيدية (تحلل البروتين) ، التي تفكك البروتين مما يؤدي إلى تطرية اللحوم أثناء التعتيق ، كما تتأثر كذلك بالحموضة (PH) وبالمعادن الموجودة باللحوم ، وتؤثر هذه الخاصية على طراوة اللحوم .

٥ ـ الطراوة Tenderness :

وتقاس الطراوة بالقوة اللازمة للانغماس داخل قطعة من اللحم ، أو بالقوة اللازمة لقطع قطعة من الألياف ، أو بالاختبارات الحسية (بالمضغ) ، وهي مشكوك في نتائجها ؛ لأنها مرتبطة بالأشخاص فهناك جهاز Warner - Bratzler Shearing Machine يقرأ القوة بالرطل اللازمة لإحداث زيادة في قطر قطعة اللحم بوصة واحدة ، ويشترط أن يكون قطاع اللحم دائرياً قدر الإمكان . فكلما زادت القوة اللازمة لإحداث الزيادة كلما قلت درجة ليونة اللحم . رغم دقة هذه الطريقة إلا أنها لا تعطي فكرة عن مدى درجة استساغة اللحم .

٦ ـ المحتوى الملحي Salt Content :

يستخدم الملح لحفظ اللحوم والأسماك وغيرها من الأغذية ، وقياس المحتوى الملحي يتطلب في أعمال المراقبة لجودة المنتجات المملحة ولأهميته من الناحية الغذائية وقد يقدر باستخدام ثاني كلوروفلورسين ، أو بإضافة نيترات الفضة لترسيب كلوريد الفضة ومعايرة الزيادة من نيترات الفضة بواسطة الثيوسيانات ، وباستخدام شرائط دليل الجاهزة ، أو بقياس التوصيل الكهربي كطريقة سريعة لتقدير الملح في منتجات الأسماك التي يزيد محتواها الملحي عن ٠,٥ ٪ وخطوات التقدير بالطريقة الأخيرة :

١ ـ اقطع العينة بسكين حاد ، واخلطها في خلاط أو مجنس حسب حالتها مع كمية

معلومة من الماء المقطر .

٢ ـ رشح جزء من المستخلص .

٣ ـ قدر التوصيل الكهربي بوحدات Milli - mho باستخدام جهاز التوصيل الكهربي Electrical Conductivity .

٤ ـ احسب تركيز الملح من منحنى قياسي بقياس التوصيل الكهربي لمحاليل قياسية متدرجة التركيز من كلوريد الصوديوم على نفس درجة حرارة قياس التوصيل الكهربي للعينات .

ويلاحظ وجود بعض الخطأ الراجع لوجود أملاح طبيعية ، حيث إن هذه الطريقة غير متخصصة للصوديوم فقط ، بل يدخل فيها كل الأملاح غير العضوية القابلة للتأين إذ إن مقاومة بيئة مائية لتدفق تيار كهربي تختلف بشكل يتناسب عكسياً مع تركيز الأملاح غير العضوية الذائبة .

في حالة نقص تركيز الملح يفضل طريقة معايرة نترات الفضة .

٧ ـ محتوى العظام Bone Content :

قد يتواجد العظام أو شظايا عظام في اللحوم والأسماك ومنتجاتها ، إما لسوء عملية التشفية ، أو كغش تجاري ، مما يستلزم تقدير محتوى العظام للحكم على كفاءة عملية التشفية ولأعمال مراقبة جودة المنتجات . وهناك بعض الأجهزة تستطيع تحطيم العظام كاملاً (كما في صناعة اللحوم) ، فهنا يلزم تقدير الكالسيوم كمقياس لمحتوى العظام . ولتقدير محتوى العظام في منتجات الأسماك قد يستخدم المزج الطبيعي ، صودا كاوية ١ مولر مع كلوروفورم ، أو الهضم في بابائين Papain أو بيبسين أو يوريا مع الغسيل لهتك اللحم واكتشاف الجزيئات الغريبة (عظام وطفيليات) .

وطريقة الهضم سهلة الأداء مع كل أنواع السمك لفصل شظايا العظام من اللحم . وفي الأسماك الغنية بالدهن ، ينزع دهنها أولاً بالرج (مقلب مغناطيسي) لمفروم العينة مع الميثانول والكلوروفورم (١/١) ، وسكب المذيب بحرص حتى لا يفقد شيئاً من شظايا العظم ، ينقل بعد ذلك اللحم بالعظم (العينة) للهضم في محلول يوريا (٣ مولر) / صودا كاوية (٠,٠٢ مولر) بالتقليب المستمر ليلة حتى يذوب لحم العينة ، رشح على ورق ترشيح (جاف على ١٠٣°م لمدة ساعة وموزون) ، جفف ورق الترشيح بالعظام على ١٠٥°م ليلة ثم زنها بعد أن تبرد ، احسب النسبة المئوية للعظام في العينة .

٨ ـ الفقد بالطبخ Cooking Loss :

يعتبر أحد مقاييس الحكم على جودة اللحوم ، وحالة الحيوان قبل الذبح . فيؤخذ وزن معلوم من العينة (٢٥جم مثلاً) وتوضع في ماء يغلي (٢٠٠مل) ، ويستمر في الغليان

٢٠ دقيقة ، وتصفى على مصفاة واسعة الثقوب موزونة من قبل وعلى دورق معياري ٢٥٠ مل ، وتترك ٢٠ دقيقة ، ثم تجفف المصفاة من الخارج بورق نشاف . يبرد المرق ويكمل إلى العلامة بالماء ويرج ، ثم يؤخذ منه ٢٥ مل في صينية رطوبة موزونة لتقدير المواد الصلبة في هذا المرق بالتبخير حتى الجفاف على حمام مائي ، ثم في فرن تجفيف إلى ثبات وزن الصينية على ١٠٠ – ١١٠ °م .

$$\text{المواد الصلبة المفقودة في الطبخ} = \text{الوزن بعد التجفيف} \times \frac{١٠٠ \times ٢٥٠}{٢٥ \times \text{الوزن الأصلي للعينة}}$$

كما يمكن تقدير الفقد بالطبخ بوزن ٢٥٠ جم عينة ، ثم تحميرها في مقلى بها ١٠جم زيت على نار (حوالي ١٦٣ ± ١°م) مع تقليبها على فترات لمدة ٢٠ دقيقة ، ثم صف الزيت ، وزنه ، ووزن العينة ذاتها بعد التحمير فيكون :

الفقد في الرطوبة = الفقد الكلي – فقد الزيت .

٩ ـ اختبار التذوق (اختبارات حسية) :

Taste Panel Testing (Organoleptic Tests)

يجري اختبار تذوق على اللحوم ومنتجاتها للحكم على مدى جودتها بواسطة محكمين، ويفضل أن يقدم لكل محكم ٣ عينات للحكم عليها ، على أن تتشابه اثنتان منها ، وترقم العينات بحروف أو أرقام ، ولا توضع على خط واحد بل توضع في أركان مثلث عشوائياً ، وأن يبدل موقع العينتين المتماثلتين أثناء الاختبار . ينبغي تقليل الفرق بين لون العينات ، ويتم الاختبار في حجرة خافتة اللون ، ذات مصباح صغير أحمر ، وعديمة الضوضاء . ينبغي تساوي حجوم العينات ، وإذا لم تكن تستهلك ساخنة فتقدم في درجة حرارة الغرفة ، وينبغي المضمضة للفم بالماء بين كل اختبارين .

ولا ينبغي اختبار أكثر من ٣ عينات في ذات الوقت ، وإلا تشبعت الحاسة ، ويصير المحكمون أقل قدرة على تمييز الفروق البسيطة بين العينات ويرشد المحكمون لطريق التحكيم، بأن يخطروا أن أمام كل منهم ٣ عينات ، منها ٢ متماثلة والثالثة مختلفة ، والمطلوب بعد الاختبار أن يعلم أمام الإجابات الصحيحة بنعم أو لا على ما إذا كان يمكن اكتشاف العينة المختلفة ، ويقوم المحكم بتعيين العينة المختلفة ، كما يقوم بتعليل أسباب اختلافها . وتقدم العينات للمحكم على مرتين .

ويستخدم هذا الاختبار في الحكم الحسي على صفات اللحوم من قوام وعصيرية وطراوة وليونة وطعم وغيرها .

ويتم الاختيار لمحكمي هذا الاختبار بعناية تامة ، على أن يكونوا ممثلين للمستهلكين وللأعمار والجنس . يجب أن يتوفر في المكان أحواض مياه ، واستمارات التحكيم التي

تأخذ الشكل وتتناول البيانات التالية .

المحكم :	رقم الاختبار :
التاريخ :	

في العينات التي أمامك تتشابه اثنتان منهم وتختلف الثالثة ، من فضلك أشّر بأي علامة على الإجابة المناسبة :

١ ـ هل يمكنك تمييز اختلاف في هذه العينات ؟

نعم لا

٢ ـ أي العينات هي المختلفة ؟ & ☆ ∅

٣ ـ لخص وجهة نظرك لمذا تعتقد بوجود فارق ؟

كما لا ينبغي التلميح للمحكمين بأي معلومات من شأنها التدليل على صفات أو ترتيب العينات أو أي شيء من شأنه أن يوثر على الحكم . وهذا الاختبار ثلاثي الزوايا Triangle Method يحتاج لإجراء تحليل إحصائي حتى يؤدي لغايته المرغوبة . وهناك طرق أخرى لاختبار التذوق ، منها : الاختبار الزوجي Paired Test ، طريقة الاختبار المزدوج القياسي Dual Standard ، طريقة المقاييس المتعددة Multiple Standards ، طريقة التنبيه الواحد Sing le Stimuli ، طريقة الاختبار الثنائي الثلاثي The Duo - Trio Test .

ولسلامة الاختبار لابد من الحصول على عدد معين من الإجابات الصحيحة للمحكمين يتناسب مع عدد العينات أو الاختلافات المختبرة ويسأل المحكمون لإعطاء أرقام أو تقديرات للعينات المختبرة لكل صفة من الصفات المدروسة كما يلي :

ممتاز	٥	درجات
جيد	٤	درجات
مرضى	٣	درجات
مقبول	٢	درجة
غير مقبول	١	درجة

ويتم التحكيم على الصفات الطبيعية المختلفة وتعطي نسباً مئوية كالتالي :

القوام	٣٢,١ ٪
الطعم	٢٦,٧ ٪
اللون	١٦,٠ ٪
التكوين	١٢,٥ ٪
المظهر	٦,٥ ٪
الرائحة	٢,١ ٪
صفات أخرى	٤,٠ ٪

وهناك جهاز لقياس الليونة وهو Dynamometer ، فيه قوة الشد تكون أفقية وليست رأسية . وهناك أجهزة أخرى تعتمد على القوة اللازمة لثقب قطعة معينة من اللحم مثل جهاز الثاقب Penetrometer . أما استخدام طريقة المضغ Paired cuting method فى اللحوم المعاملة بالحرارة لفترة معيينة فيؤخذ مكعبان صغيران من كل قطعة لتأكيد الاختبار ، وتعطى لدرجة الليونة درجات رمزية تنقسم من ١ ـ ٥ حسب تقدير (Cover,1923) كالتالى:

لحم جامد جداً	١,٠ ـ ١,٤
لحم جامد	١,٥ ـ ٢,٤
لحم متوسط	٢,٥ ـ ٣,٤
لحم لين	٣,٥ ـ ٤,٤
لحم لين جداً	٤,٥ ـ ٥,٠

وتعتمد هذه الطريقة على الذوق والحس وتسمى بالطريقة الحسية Organoleptic or Sensory method ، وهى غير دقيقة لاعتمادها على الخبرة الشخصية وذوق القائم بالاختبار . وتسمى هذه الطرق كلها بالاختبارات الميكانيكية Mechanical tests. إلا أنه يمكن كذلك تقدير ليونة اللحم باختبارات هستولوجية Histological rating بفحص ميكروسكوبى لقطاع لحوم لدراسة عدد وسمك وشكل الألياف العضلية ومقدار النسيج

الضام Connective tissue ودراسة التناسب بين الأربطة الغشائية والعضلية وسمك وعدد الألياف العضلية ، فكلما زاد عدد الألياف العضلية داخل الحزمة العضلية الواحدة مع صغر قطر هذه الألياف كلما كان ذلك دليلاً على جودة اللحم وطراوته ، فقد استعمل Wang et al, 1956 طريقة لتقدير درجة مطاطية الألياف للحوم المعاملة بالحرارة وتسمى طريقة Fiber extensibility measuring method وذلك بنزع إحدى الألياف العضلية بعد معاملتها بالحرارة ، وتوضع تحت ميكروسكوب وتثبت من أحد أطرافها ، بينما تمسك من الطرف الآخر بواسطة ملقط ، ويحرك هذا الملقط تدريجياً إلى الخارج فيزداد طول الليفة العضلية حتى تنقطع ، وعندئذ تحسب المسافة التى تحركها الملقط ، فكلما كانت كبيرة كلما زادت درجة ليونة اللحم .

مراجع هذا الفصل هى :

– مجموعة التشريعات الصحية الخاصة بمراقبة الأغذية والألبان والمواد الملونة والحافظة (الجزء الثانى) : الهيئة العامة لشؤون المطابع الأميرية (١٩٩٢) .

- Armstrong, H. (1993) Pigs - Misset, 9 : 14.
- Arneth , W . (1984) Fleischwirtsch., 64 : 1098 .
- Bartels, H . (1968) Die Untersuchung der Schlachttiere und des Fleisches. Paul Parey , Berlin .
- Egan, H. et al. (1981) Pearson's Chemical Analysis of Foods . 8 th Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh & London .
- Gruenwedel, D. W. & Whitaker, J. R. (1985) Food Analysis, Vol 3, Marcel Dekker, N. Y .
- Klettner, P. - G. (1984) Fleischwirtsch., 64 : 1082 .
- Klettner, P. - G . & Stiebing, A. (1980) Fleischwirtsch., 60 : 1970 .
- Lees , R. (1975) Food Analysis , 3 rd Ed., Leonard Hill Books , London .
- Pearso , D. (1970) The Chemical Analysis of Food . Surry & Chirchill, London .
- Stiebing, A. & Klettner, P. - G . (1980) Fleischwirtsch., 60 : 2179 .
- Stolle, A. et al . (1994) Die Fleischerei, 45 : 15 .
- Tsoladze, E. A. (1978) Fish Indusry. 48 .

الفصل الرابع

البيــض

١ ـ الجودة الخارجية :

تجرى الاختبارات المختلفة على البيض للحكم على المظهر الخارجي والمحتويات الداخلية للبيض لتقدير جودة البيض . ومن المقاييس الخارجية التى تقدر للبيض :

وزن البيضة ، شكل البيضة ، لون القشرة ، سلامة القشرة ، نظافة القشرة ، سمك القشرة .

بوزن البيضة يمكن تدريجه بحيث يتم تجميع كل فئة من الأوزان معاً . والميزان قد يكون بمؤشر لوزن البيض فردياً بالضبط ، أو بموازين يمر عليها البيض فى مسار مكون من أثقال مختلفة عند كل منها تدحرج البيضة حسب وزنها فتمر على مجرى من الكاوتشوك حيث تجمع كل بيضة حسب وزنها وتأخذ تقييماً يشير لوزنها إما : A أو B أو C أو D .

أما شكل البيضة فهو عادة بيضاوى (وهو المفضل فى قطيع البيض ، ويقدر بنسبة ٧٥٪) أو مستدير أو كروى (١٠٠ ٪) أو مستطيل (٥٠٪) أو مدبب الطرفين . وترجع أهمية الشكل البيضاوى إلى أنه هو الشكل المناسب لبيض التفريخ . ويتم الحكم على شكل البيضة بالعين المجردة أو باستخدام المعادلات الرياضية :

$$\text{دليل شكل البيضة} = \frac{\text{القطر العرضى}}{\text{القطر الطولى}} \times ١٠٠$$

لون البيضة يكون أبيض فى دجاج البيض وبنى فى دجاج اللحم وثنائى الغرض ، ولون القشرة لا يؤثر على القيمة الغذائية للبيض إلا أنه يرتبط بذوق المستهلك ، وهو صفة وراثية فى الدواجن .

سلامة القشرة أى خلوها من الشروخ والشقوق حتى يسهل تسويقها وتداولها دون فقد محتوياتها الداخلية ، وتقدر بالعين المجردة أو بالغلى فى الماء فترة وجيزة وتحديد سلامة القشرة فى عينة من البيض .

نظافة القشرة من الأقذار والبكتريا وكذا خلوها من الروائح يلعب دوراً فى تسويق البيض، ويؤثر بشدة على نسبة الفقس وإنتاج كتاكيت سليمة ولتنظيف البيض لا تبل بل تمسح بقطعة من القماش .

سمك القشرة مقياس مهم سواء لبيض المائدة لتداوله فى الأسواق أو لبيض التفريخ حيث يمد الجنين بالكالسيوم من القشرة وتساعد على تنفس الجنين وحمايته . ويقاس السمك بالميكرومتر أو من المعادلات الرياضية :

$$\text{متوسط سمك القشرة سم} = \frac{\text{وزن القشرة جافة جم}}{\text{كثافة القشرة} \times \text{مساحة مسطح البيضة سم}^2}$$

حيث إن كثافة القشرة تقدر بـ ١,٩٦ .

مساحة مسطح البيضة ، ويتم حسابه من المعادلة :

$$\text{مساحة مسطح البيضة سم}^2 = 2\text{ط ب}^2 + \frac{2\text{ ط أ ب جا}^{-1}\text{ هـ}}{\text{هـ}}$$

حيث إن ٢ب = العرض م

٢أ = الطول م

$$\text{ط} = \frac{22}{7}$$

$$\text{هـ}^2 = \frac{\text{أ}^2 - \text{ب}^2}{\text{أ}^2}$$

أو = ٠,٩١٠٩ × (ل × ٠,٢٨٩) × (ب × ٠,٣١٦٤) × (و × ٠,٤٨٨٢)

حيث ل = الطول سم ، ب = العرض سم ، و = الوزن جم .

أو مساحة مسطح البيضة سم٢ = ٤,٦٧ × و ٠,٦٧

حيث و = وزن البيضة الطازج جم .

هذا كما يتم حساب نسبة القشرة بأغشيتها كنسبة مئوية من وزن البيضة كما يحسب سمك أغشية القشرة بطرح سمك القشرة من سمك القشرة مع أغشيتها .

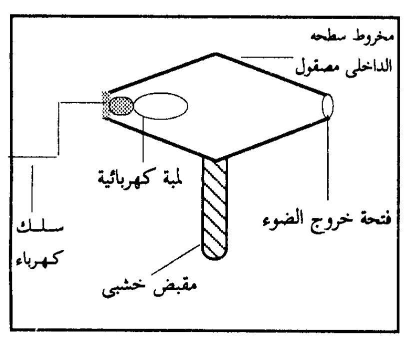
٢ ـ ولتقدير جودة البيض الداخلية يجرى أحد الاختبارات التالية :

أولاً : الفحص بالماء :

بوضع البيضة فى إناء به محلول ملحى ١٠ ٪ ، فإن كانت جيدة رست فى قاع الإناء على جانبيها ، وهذا دليل على طزاجة البيضة ، وإذا كان البيض غير طازج اتجه الطرف العريض لأعلى وتطفوا البيضة إلى أعلى ، وتعوم على سطح الماء كلما كبرت الغرفة الهوائية فى الحجم ، ويكون تمام عومها فى حالة فسادها .

ثانياً : الفحص الضوئى:

وبه يمكن كشف عيوب البيضة بواسطة مصباح كهربائى فى حجرة مظلمة ، وكلما ضاقت فتحة مرور الضوء كلما كان ظل المكونات الداخلية (صفار، غرفة هوائية ، كلازا ، طبقات البياض) أوضح . والبيض الجيد يكون



خالياً من الشقوق والشروخ ، وكون الصفار ثابتاً فى الوسط ومعتماً خفيفاً دليل على متانة الكلازا ، أما فى البيض المخزن تكون الكلازا أضعف، ويتجه الصفار قرب القشرة فيكون معتماً بشدة وحركته أسرع لقلة ثباته . جودة وطزاجة البيض تتوقف كذلك على حجم الغرفة الهوائية البسيط ، وعدم وجود أى فقاعات غازية بها وأن تكون فى الطرف العريض للبيضة . فكلما كبرت الغرفة الهوائية فى الحجم دل ذلك على عدم طزاجة البيض . يوضح الفحص الضوئى كذلك مدى وجود بقع دموية أو كتل لحمية ذات اللون الغامق ، والتى يقلل وجودها من قيمة البيض .

ثالثاً : الفحص بكسر البيض :

لفحص الجودة الداخلية من حيث الرائحة والطعم ولون الصفار يلزم كسر عينة من البيض للحكم على جودة وصلاحية البيض . ومن الاختبارات التى تجرى على مكونات البيضة الداخلية أولها : حساب نسبة الصفار كنسبة مئوية من وزن البيضة ، كذلك دليل أو معامل الصفار ، وهو نسبة مئوية لارتفاع الصفار بالنسبة لقطره ، كما تقدر نسبة الألبيومين كنسبة مئوية للبياض من وزن البيضة ، حيث يعين وزن الألبيومين بطرح وزن الصفار والقشرة من وزن البيضة . هذا وتقدر كذلك ما يلى :

الرائحة والطعم : والتى قد يكون سببها وراثياً كما فى الرائحة السمكية التى تعطيها بعض الدجاجات لبيضها أو قد تنتج من المواد ذات الروائح (بصل ، ثوم ، لفت ، مطهرات، قذارة العشوش) التى تجاور البيض فى تخزينه .

معامل الصفار : ويقل بزيادة فترة التخزين ويقترب من ٥٠ ٪ للبيض الجيد ويقل عن ٤٠ ٪ فى حالة عدم الطزاجة .

نسبة البياض الكثيف : يتحكم فيها عوامل وراثية إلا أن النقل بدون عناية يقلل من كميته فيتحلل الميوسين مائياً ويزيد البياض الخفيف على حساب البياض الكثيف ، وتقدر نسب البياض الكثيف بالفحص الضوئى أو باستخدام منخل يمر خلاله البياض الخفيف ويحجز البياض الكثيف .

لون الصفار : تتحكم فيه بجانب العوامل الوراثية كذلك نوع مواد العلف الداخلة فى تركيب عليقة الأمهات البياضة خاصة من الذرة الصفراء والأعلاف الخضراء أو مساحيقها. واللون ضرورة يفرضها السوق أو ذوق المستهلكين ، كما يتأثر اللون بالتخزين خاصة لو كان البيض لأمهات غذيت على كسب قطن لوجود الجوسيبول ، فيتحول لون الصفار بالتخزين إلى اللون الزيتونى ، ويقاس اللون فى الصفار بقرص عليه الألوان ودرجاتها ويسمى Roche Yolk Colour Fan وتشير قراءاته :

تدريج	لون
١	أصفر شاحب
٢	أصفر خفيف
٣	أصفر متوسط
٤	أصفر غامق
٥	برتقالى مصفر خفيف
٦	برتقالى مصفر متوسط
٧	برتقالى مصفر غامق
٨	برتقالى خفيف .

مراجع ينصح بالرجوع إليها لمزيد من التفاصيل :

- AOAC (1984) Association of official Agricultural Chemists . 14 th Ed. Washington .
- Carter, T. C. (1968) Br. Poult . Sci., 9 : 165 .
- Egan , H. et al. (1981) Pearson's Chemical Analysis of Foods. 8 th Ed. , Churchill Livingstone, Edinburgh & London .
- Gruenwedel , D. W. & Whitaker , J. R. (1985) Food Analysis. Vol. 3 Marcel Dekker , N. Y .
_ Lees , R. (1975) Food Analysis . Leonard Hill Books , London .
- Stadleman , W. J. (1977) In : Stadelman , W. J & Coterill , O. J . (eds.) Egg Science and Technology. 2 nd Ed. AVI. , Connecticut .
- Well, R. G. (1968) In : Carter , T. C (ed.) A Study of the hen's egg Oliver & Boy , Edinb

الفصل الخامس

الـــدم

١ ـ سرعة ترسيب كرات الدم الحمراء :

Sedimentation Rate

تتوقف سرعة ترسيب كرات الدم الحمراء فى الدم الممنوع من التجلط على عدة عوامل، مثل تركيب بورتين البلازما (جلوبيولين ، ألبيومين ، فيبرينوچين ، بروتينات مرضية) ، وكذا عدد وشكل ومسطح كرات الدم الحمراء .

تسحب بسرنجة ٠,٤ مل سترات صوديوم ٣,٨ ٪ معقمة + ١,٦ مل دم ، وتخلط فى المحقن جيداً دون تكوين رغاوى، تنقل إلى أنابيب خاصة مثبتة رأسياً على حرارة الغرفة، ويقدر قيمة الانخفاض عند الحدود بين عمود كرات الدم الحمراء والبلازما ، وذلك بعد ساعة وساعتين ، وتزداد سرعة الترسيب فى حالات الالتهابات الحادة والزمنة ، والخراجات الخبيثة ، مرض الكلى ، أمراض الدم ، الحمل ، نقص عدد كرات الدم الحمراء ، وتبطؤ سرعة الترسيب بزيادة عدد كرات الدم الحمراء ، أمراض الكلى ، اضطرابات القلب ، تعاطى بعض العقاقير (كورتيكويد ، ساليسيلات ، ثيوسيمى كاربازون وغيرها) .

٢ ـ النسبة الحجمية للمكونات الخلوية :

يقدر الحجم النسبى للمكونات الخلوية للدم بالنسبة للبلازما وتعرف بالهيماتوكريت Haematocrit (Packed cell Volume, PCV) باستخدام أنابيب طرد مركزى دقيقة مغطاة من الداخل بالهيبارين ، ويسحب بها الدم ثم تسد إحدى فوهاتيها باللهب ، وتطرد مركزيا فى جهاز خاص بهذه الأنابيب يسمى جهاز الهيماتوكريت ، وذلك لمدة ٣ - ٤ دقائق فترسب جسيمات الدم أو مكوناته الخلوية ويعلوها البلازما ، فيوضع على الأنابيب مقياس مدرج حتى ١٠٠ ٪ فيقاس نسبة المكونات الخلوية كنسبة مئوية من حجم العينة الكلى بالأنابيب .

٣ ـ عد المكونات الخلوية :

يستخدم لذلك جهاز هيموسيتوميتر Haemocytometer يحتوى على شريحة (مقسمة إلى مربعات صغيرة حجم كل منها   م٣)، علاوة على ماصتين ، إحداهما تستخدم لعد كرات الدم الحمراء (لتخفيف العينة إلى ١٠٠ ـ ٢٠٠ مرة) ، والأخرى تستخدم للتخفيف عند عد كرات الدم البيضاء إلى ١٠ ـ ٢٠ مرة .

فيجهز محلول تخفيف من ملح الطعام بتركيز ٠,٩ ٪ ، أو محلول للحفظ من ٢ جم كلوريد صوديوم + ٧,٥ جم كبريتات صوديوم + ١ جم ثانى كلوريد زئبق + ٢٠٠ مل

ماءاً مقطراً .

يسحب الدم بالماصة (ماصة كريات الدم الحمراء) إلى العلامة ١,٠ أو ٠,٥ (للتخفيف ١٠٠ أو ٢٠٠ مرة) ، ثم يكمل بسحب محلول التخفيف إلى العلامة ١٠١ ، وذلك بسرعة كى لا يتجلط الدم ، ويسد الأنبوبة الشعرية للماصة . ترج الماصة ٢ ـ ٥ دقائق للمزج .

بالضغط على الأنبوبة المطاطية يتدفق المحلول ، فتوضع منه نقطتان لتوزع على المربعات على شريحة الهيموسيتوميتر ، ثم تغطى الشريحة بغطاء زجاجى . تفحص الشريحة بالقوى الصغرى فالكبرى ، وينتظر دقيقتان حتى تترسب كريات الدم الحمراء فى القاع ، فتعد الموجود منها فى ٨٠ مربعاً صغيراً (٥ مربعات كبيرة كل منها يحتوى ١٦ مربعاً صغيراً) . فيكون عدد كريات الدم الحمراء فى ١ م٣

$$= \frac{\text{عدد كريات الدم الحمراء فى ٨٠ مربعاً صغيراً} \times ٤٠٠٠ \times ٢٠٠}{٨٠}$$

= عدد كريات الدم الحمراء فى ٨٠ مربعاً × ١٠٠٠٠

على فرض أن التخفيف ٢٠٠ مرة ، وأن حجم المربع الصغير $\frac{١}{٤٠٠٠}$ م٣.

ولتقدير عدد كريات الدم البيضاء تستخدم الماصة الخاصة بذلك ، ويستخدم محلول تخفيف خاص من حمض خليك تركيز ٠,٣ ٪ لتكسير كريات الدم الحمراء ، ويضاف إليه صبغة أزرق الميثلين (١ ,٠ ٪) لصبغ أنوية كريات الدم البيضاء باللون الأزرق ، وبنفس الطريقة سابقة الذكر لتقدير عدد كريات الدم الحمراء ، يتم حساب عدد كريات الدم البيضاء فى ١ م٣ $= \frac{\text{عدد كريات الدم البيضاء فى ٤٠٠ مربعاً صغيراً} \times ٤٠٠٠ \times ١٠}{٤٠٠}$

= عدد كريات الدم البيضاء فى ٤٠٠ مربعاً صغيراً × ١٠٠

بفرض التخفيف ١٠ مرات ، وحجم المربع الصغير $\frac{١}{٤٠٠٠}$ م٣ .

ولتقدير عدد الصفائح الدموية تملأ ماصة كريات الدم الحمراء بالدم حتى العلامة ٠,٥ ثم يخفف الدم بمحلول ٣٪ سترات صوديوم حتى العلامة ١٠١ ، ثم يقدر عدد الصفائح الدموية وعدد كريات الدم الحمراء ، وتظهر الصفائح الدموية فى شكل أجسام بيضاوية صغيرة مفلطحة ، عديمة النواة وتحدث انكساراً شديداً للضوء ، ويعبر عن عددها لكل ١٠٠٠ كرية دموية حمراء .

٤ ـ تقدير الهيموجلوبين :

قد يستخدم لذلك جهاز هيموجلوبينوميتر Haemoglobinometer ، الذى يتكون من ٣ أنابيب ، اثنتان طرفيتان مملوءتان بمحلول قياسى يحتوى ١٧,٣ ٪ هيموجلوبين ، والوسطى

على نفس الحامل مدرجة تدريجاً مئوياً ، جم/١٠٠مل ، وحدات Sahlye . فتملأ الماصة المرفقة إلى العلامة ٢٠مم٣ ، وتصب فى الأنبوبة الوسطية المدرجة المحتوية على حمض هيدروكلوريك ٠,١ ع حتى التدريج ١٠ ، على أن يفرغ الدم من الماصة فى قاع الأنبوبة ، وتغسل الماصة عدة مرات فى نفس الحمض الذى تحتويه الأنبوبة . وتمزج محتويات الأنبوبة بمحرك زجاجى ملحق بالجهاز ، وذلك لمدة ٥ دقائق . يخفف المحلول تدريجياً بماصة أخرى مدرجة مملوءة بماء مقطر ، وذلك حتى يتماثل لون المحلول مع لون المحلول القياسى فى الأنبوبتين الجانبيتين . يقرأ التدريج عند مستوى سطح المحلول بعد التخفيف ، فيعبر عن النسبة المئوية للهيموجلوبين فى الدم مقارنة بالمحلول القياسى ، وقد يحول التركيز إلى نسبة مطلقة جم / ١٠٠مل بضرب نسبة الهيموجلوبين المئوية فى ٠,١٧٣ .

ويزيد هيموجلوبين الدم فى حالة تركيز الدم أى الجفاف ، بينما يزيد حديد الدم فى حالات التهاب الكبد المعدى ، Haemochromatosis ، بينما يقل فى حالات أنيميا نقص الحديد ، سواء لعجز الامتصاص أو عدم وفرة الحديد فى العلائق ، أو للإصابة بالنزيف ، أو الإصابة بالاسقربوط .

٥ ـ الفيبرينوجين :

يترسب الفيبرين بتسخين البلازما على ٥٦° م فيجرى عمل مخلوط من محلول سيترات صوديوم ٣,٨٪ ودم بنسبة ١+٩ لفصل البلازما . ويوضع ١ مل من هذه البلازما فى أنبوبة طرد مركزى مدرجة ، ثم توضع الأنبوبة فى حمام ماء على ٥٦° م لمدة ١٠ دقائق ، ثم تطرد مركزياً بسرعة ٢٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق ، ويقاس حجم الراسب بالمليلتر والذى يعبر عن الفيبرين ، ويحول لمكافئاته من الفيبرينوجين مجم /١٠٠ مل طبقاً لكداهل من الجدول التالى :

مل فيبرين (بالتدفئة)	مجم فيبرينوجين / ١٠٠مل
٠,٠٩	٦٢٥
٠,٠٨	٥٦٠
٠,٠٧	٥٠٠
٠,٠٦	٤٣٠
٠,٠٥	٣٧٠
٠,٠٤	٣٠٠
٠,٠٣	٢٤٠
٠,٠٢	١٨٠
٠,٠١	١٢٠

وتعتبر القيم عالية لو زادت عن ٠,٠٧ مل فيبرين ، ومنخفضة لو قلت عن ٠,٠٤ مل فيبرين . وتزيد فى حالات الخراجات والالتهابات ومرض الكلى ، بينما تقل قيم الفيبرينوجين فى حالات أمراض الكبد ونقص البروتين فى العليقة .

المراجع التى يمكن الرجوع إليها لمزيد من التفصيل :

- Merck , E . (1974) Klinisches Labor, 12 . Auflage, Merck, Darmstadt .
- Merck, E. ((1976) Labordiagnostik in der Tiermedizin . Merck, Darmstatd .
- Merck, E. (1980) Arbeitsanleitungen für die klinische Chemie, Diagnostica Merck, Darmstadt.
-Soliman, M. k. & Abd El Moty, I . (1976) A modern approach to veterinary clinical &laboratory diagnosis . THe Scientific Book Centre , Cairo .
-Wells, B. B. (1962) Clinical pathology . 3 rd Ed., Saunders, Philadelphia & London .
- Wootton , I. O. P. (1974) Microanalysis in medical biochemistry, 5 th Ed., Churchill, London

الباب الثالث

التحليل الكمى الكيماوى
والطبيعى ـ كيماوى

ينقسم التحليل الكمى إلى :

أ ـ تحليل كمى بالوزن Gravimetric analysis .

ب ـ تحليل كمى بالحجم Vlumetric analysis .

جـ ـ تحليل كمى بالطرق الطبيعية والكيماوية Physical and Chemical analysis .

د ـ تحليل كمى عن طريق الغاز المتصاعد Gasometric analysis .

والأقسام الأربعة من طرق التحليل الكمى يمكن إجراؤها باستعمال كميات بسيطة جداً من المادة ، ويسمى التحليل هنا Micro quantitative chemical analysis بالميكرو ويستعمل فيها كميات فى حدود عدة مليجرامات ، وإذا استعملت كميات أكبر نوعاً بحيث لا تزيد عن نصف جرام فتسمى الطرق فى هذه الحالة بالسيمى ميكرو Semi-Micro quantitative chemical analysis ، وقد يمكن استعمال كميات كبيرة تزيد عن النصف جرام وتسمى الطرق فى هذه الحالة بالماكرو Macro quantitative chemical analysis .

والتحليل الغذائى هو تحليل كميائى ، فبالتالى يلزمه الدقة والحرص والنظافة والإلمام الكامل بالاستعمال الصحيح للأدوات المعملية ، وذلك لأن ، نتائج التحليل قد يتوقف عليها تقدير الكميات التى تعطى من مادة العلف المحللة للحيوانات ، أو قد يتوقف عليها تسعير مادة العلف ، أو إثبات كفاءة وصلاحية مادة العلف بشهادة للقضاء ، أو قد تفسر حالات إصابة أو مرض أو تسمم ونفوق من المادة الغذائية هذه ، وعلى ذلك فعدم الدقة للنتائج المتحصل عليها من التحليل تؤدى إلى إرباك الأمور المتعلقة بالتغذية ، أو التسعيرة أو الرقابة التموينية ، أو قد تدين بريئاً ، أو تجرم منتجاً ، أو تبرئ مجرماً ، نتيجة خطأ فى تحليل بروتين أو رماد أو دهن ... إلخ ، مما يستلزم الدقة والضمير والمسئولية العلمية على القائم بالتحليل .

أغراض التحليل الغذائى :

١ ـ معرفة القيمة الغذائية لمادة أو منتج ما .

٢ ـ على أساسه يمكن تقدير جودة المادة أو المنتج .

٣ ـ يستخدم كمقياس وحكم فاصل بين البائع والمشترى .

٤ ـ وسيلة للتسعير ووضع الضرائب ، أو الرسوم الجمركية على المنتج أو المستورد .

٥ ـ قد يؤخذ كمقياس للغش أو الفساد أو الإصابة بمرض أو بتسمم .

جهات التحليل :

١ ــ معامل خاصة لغرض إرشاد المشترى عن جودة المنتج من عدمه .

٢ ــ معامل المصانع المنتجة لتساعد على إيجاد ناتج متجانس مطابق للمواصفات القياسية.

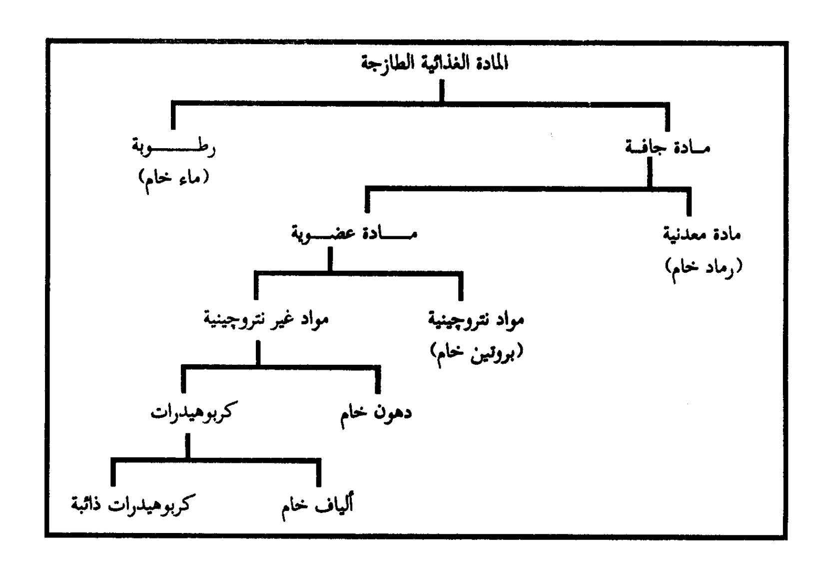
٣ ــ معامل وزارتى الزراعة والصحة كجهة حكومية تعتمد نتائجها أمام الهيئات ، وتقوم بمسح شامل لكافة الأغذية ومواد العلف والمنتجات الحيوانية بتحليلها وتقييمها .

٤ ــ المعامل البيطرية تفحص مواد العلف والمنتجات الحيوانية من حيث مابها من سموم ومسببات أمراض وخلافه ، وتتعاون مع معامل الصحة فى ذلك .

التحليل الغذائى الروتينى

فى الواقع لا يمكن حصر المركبات الكيماوية العضوية وغير العضوية التى تدخل فى تكوين مادة ما بالضبط ، إذ إن المعروف أن هذه المركبات عديدة جداً ، ولا تمضى فترة من الوقت إلا ويكتشف مركب جديد فى المواد الغذائية ، نتيجة استحداث وجود هذا المركب ، أوالنجاح فى فصله وتقديره والتعرف عليه نتيجة تقدم الأجهزة المستحدثة فى مجال التحاليل الكيميائية . إلا أنه يمكن تقسيم هذه المركبات العديدة إلى مجاميع رئيسية، تشمل كل منها مجموعة المركبات المتقاربة فى فائدتها ، أو تركيبها ، والتى تشترك جميعها فى خاصية معينة تميزها وتستخدم للاستدلال عليها وصفياً وكمياً ، كأن تحتوى مجموعة مركبات على عنصر النتروجين فى تركيبها ، فتنضم كلها فى قسم واحد يعرف باسم المواد النتروچينية أو البروتين الخام ، ومجموعة أخرى تشترك فى قابليتها للذوبان فى مذيب معين كالأثير فتضم معاً كلها فى قسم واحد يعرف بالمستخلص الأثيرى أو الدهن الخام ، وهكذا كما وضح من النظام الذى وضعه العالمان Henneberg & Stohmann, 1860 فى مدرسة الزراعة فى Weende التابعة لمدينة Göttingen منذ مايزيد عن قرن وربع ، ومازال يتبع فى جميع بقاع العالم فى تحليل أى مادة غذائية ، وذلك نقلاً عن العالمين الألمانيين الغربيين ، ويطلق على هذا النظام بتحليل « فندا » وبالألمانية "Weender-FM- Analyse" ، ويبنى أساساً على تحليل المواد المطحونة، وتنسب التحاليل للمادة الجافة تماماً.

أوجز هذا النظام فى الشكل الإيضاحى التالى :



ومن المواد الغـذائيـة (إن صح إطلاق ذلك على كل مكونات الغـذاء نبـاتيـاً كـان أو حيوانيا) المعروفة مايزيد عن ٥٠ مركباً مختلفاً ، توجد بتركيزات مختلفة ، ونسب هضمها تختلف كذلك باختلاف كمية المواد الدعامية . والأقسام الأساسية (كما سبق رسم كروكى لها) تختلف فى تركيبها وكميتها فى المواد المختلفة . وتتركز الكربوهيدرات فى النباتات عنها فى المواد حيوانية المصدر التى لا تتعدى محتواها من الكربوهيدرات ١ ٪ ، بينما تتركز بها الدهون كمخزون الطاقة ، كما أنها غنية بالبروتين جداً عن المواد النباتية .

وطبقاً لتحليل فندا Weender Feedstaffs Analysis تقـدر كل مـن الرطـوبـة (أو الماء الخام)، والمادة العضوية ، والمستخلص الخالي النيتروجين ، والاميدات عن طريق الفرق ، بينما تقدر كل من المادة الجافة ، والمادة غير العضوية (أو الرماد الخام) والألياف الخام ، والدهن الخام ، والبروتين الخام ، والبروتين الحقيقي بالتحليل المباشر ، حيث إن الماء الخام هو كل ما يتطاير من مادة العلف عند تجفيفها على درجة حرارة ١٠٥°م لمدة ٣ ساعات ، وهو ـ أعلى ـ لحد ما عن قيمة الماء الحقيقية ، بمقدار ما يتطاير مع الماء من أحماض عضوية وأمونيا . والمادة الجافة بالفرق بين المادة الطازجة والماء الخام ، وهى مواد عضوية ومعدنية .

والمواد العضوية أغلبها كربون ؛ لذا تحترق بالترميد على ٥٥٠°م ، بينما الرماد الخام أو المكونات غير العضوية هو المتبقي بعد هذا الترميد ، فالمادة العضوية بالفرق هي مطروح الرماد الخام من المادة الجافة . ويحتوي الرماد الخام على الرماد الحقيقي بالإضافة للرمل

والطين . بينما المادة العضوية تشمل البروتين الخام المقدر بطريقة كلداهل كنيتروچين (١٦ ٪ من البروتين) مضروباً في ٦,٢٥ ، وإن اختلف هذا المعامل باختلاف نسبة أزوت بروتين كل مادة علف ، فأزوت بروتين القمح ١٧,٥ ٪ (المعامل ٥,٧١) والشعير ١٧,٢ ٪ المعامل (٥,٨٢) والذرة ١٥,٦ ٪ المعامل (٦,٣٩) ، ولكن للتقديرات العملية وللتسهيل يستخدم معامل متوسط هو ٦,٢٥ . وبترسيب البروتين الحقيقي بمادة مرسبة كهيدروكسيد النحاس أو التانين ، وتقديره بكلداهل نحصل على قيمته ، وما لم يرسب من مركبات أخرى محتوية على الأزوت تسمى بالأميدات تقدر بالفرق بين البروتين الخام والبروتين الحقيقي . وتشمل الأميدات هذه أميدات حامضية ، وأحماض أمينية حرة ، وببتيدات بسيطة ، وجليكوزيدات محتوية أزوت (والمسماة بالقلويدات وهي مركبات حلقية ذات قواعد نيتروچينية) ، والبيتائين Betain ، والزانثين Xanthin ، والجوانين Guanin وخلافها .

والدهن الخام ـ أي المستخلص ـ الأثيري مجموعة كبيرة من المركبات غير المتجانسة ، تشترك في خاصية واحدة هي الذوبان في الأثير والبنزول والمذيبات العضوية المشابهة ، وبعض مكوناتها مثل الصموغ والراتنجات والشموع ، والمواد الملونة لا تمد بالطاقة ، والمواد الفقيرة الدهن والملونة كالحشائش والدريس تحتوي ٢٠-٤٠ ٪ من الدهن الخام ليس دهناً حقيقياً (جليسريدات ثلاثية) ، بينما الدهن الخام في المنتجات الحيوانية والبذور يتكون أساساً من الدهون الحقيقية . ويتكون الدهن الخام بجانب الجليسريدات الثلاثية ، كذلك فوسفاتيدات ، وفوسفوليبيدات ، وستيرويدات ، وشموع ، وكلوروفيل ، وكاروتين ، وزانثوفيل ، وزيوت اثيرية ، وأحماض عضوية وغيرها . بينما الألياف الخام هي كل ما لا يذوب في الأحماض والقواعد من المادة الغذائية المتبقية (خالية الدهون والأزوت والرماد) ، وتشمل السليلوز ، والنبتوزان ، واللجنين ، والسوبرين ، والكيوتين ، إلا أن بعض هذه المكونات يتجه للمحاليل، ويحسب مع المركبات التي يحتويها المستخلص خالي النيتروچين، والذي يضم كل المواد سهلة الذوبان التي لم تقدر في التحاليل الأخرى ، ويقدر بالفرق بين المادة العضوية مطروحا منها البروتين الخام والدهن الخام والألياف الخام ، ويضم كل أنواع السكريات ، والنشا ، والجليكوچين ، والانيولين ، والهيمي سيليلوزات ، والبكتين (وكذلك الأجزاء الذائبة من السليلوز والبنتوزات واللجنين) .

عيوب طريقة ڤندا Weender Feedstuffs Analysis :

١ ـ تقوم هذه الطريقة على تقدير مجاميع مواد لا تتفق معاً في تركيبها الكيماوي ، أو في قيمتها الفسيولوچية ، ويطلق على هذه المجاميع بالمركبات الغذائية الخام .

٢ ـ بعض هذه المركبات الغذائية الخام لم يتحصل عليها نتيجة تحليل فعلي ، وذلك كما في مكونات المستخلص خالي النيتروچين ، كما تتحمل هذه المكونات المقدرة بالفرق

أخطاء التحاليل والتقديرات الأخرى .

٣ ـ أضعف نقطة وأهم عيب هو تقسيم الكربوهيدرات إلى ألياف خام ومستخلص خالي النيتروجين ، فكان من الأحرى والأوجب التمييز بين الكربوهيدرات الأكثر ذائبية والكربوهيدرات الأقل ذائبية . فبتقدير الألياف الخام فإنه في الواقع يتم تقدير جزء معين (كبر أم صغر) من المواد الدعامية (سليلوز ، بنتوزان ، لجنين) ، يتوقف على نوع مادة العلف ، بينما يتخلف الجزء الآخر من هذه المواد الدعامية في المحلول ، ويعد ضمن المواد المكونة للمستخلص خالي الأزوت ، وهذا يؤدي في بعض الحالات إلى حساب معدلات هضم عالية للألياف الخام عنها للمستخلص خالي الأزوت .

ورغم هذه العيوب إلا أنها تتميز بما يلي :

١ ـ أنها طريقة سهلة وسريعة ورخيصة التكاليف نسبياً .

٢ ـ تناسب لحد كبير التحليل الروتيني لمجاميع العينات .

٣ ـ تم بناء النظام الكامل لعلم التغذية على هذا النظام للتحليل .

٤ ـ للانتقال إلى نظام آخر فعّال يتطلب ذلك وقتاً طويلاً جداً .

الفصل الأول

الرطوبة والمادة الجافة Dry Matter Determination :

يوجد الماء في مواد العلف بنسبة تتراوح ما بين ١٠٪ أو أقل (في الحبوب) إلى ٩٠٪ (في مواد العلف الخضراء) . ويوجد الماء في الأغذية في عدة صور كوسط للإذابة ، أي في صورة حرة أو ماء حر Free Water ، وفي صورة ماء تبلور Water of Crystallization أي في صورة اتحاد كيماوي مع مركبات مختلفة في صورة هيدرات Hydrates ويسمى ماء التأدرت ، وفي صورة ماء مدمص على السطح Adsorbtive Water ويسمى بالماء الهيجروسكوبي Hygroscopic Water ، وهو ماء مدمص على سطوح الحبيبات الغروية في البروتوبلازم فتحتفظ مكونات الخلايا وجدرانها من بروتينات ونشا وسليلوز تحتفظ كلها بالماء بقوة ، كما يوجد الماء أيضاً في صورة مندمجة مع المواد العضوية خاصة الغرويات المحبة للماء Hydrophylic Colloids .

وتقدير الماء هام للغاية حتى يتسنى بذلك حساب نسبة المكونات الأخرى على أساس الوزن الجاف ، كما أن مظهر المواد الغذائية وقابليتها للحفظ تتوقف إلى حد كبير على محتواها الرطوبي ، فهناك حد أدنى لنسبة الرطوبة التي تسمح بنمو الأحياء الدقيقة . وعند تعريض مادة غذائية لحرارة متصاعدة فإنها تفقد أولاً ماءها الحر فقداً تاماً ، يتبعه فقد تدريجي في الماء المندمج طبيعياً ، أو الماء المدمص ، يليه فقد نتيجة الهدم والتحلل Decom-position ، وعند ذلك يحدث فقد بالتطاير للمواد الطيارة Volatile Substances . ولم يمكن تحديد ظروف معينة ، بالضبط يمكن أن يقال عنها إن التخلص التام من كل الرطوبة يحدث فيها دون أي فقد آخر ، وعليه فنسبة الرطوبة اصطلاح نسبي أكثر منه اصطلاح مطلق ، كما أنه لا بد من تحديد كل الظروف التي أجريت عندها عملية التقدير.

ملاحظات عامة على تقدير الرطوبة :

بعض المواد الغذائية تحتوي قدراً من الماء مرتبطاً بشدة ولا يطرد أثناء التجفيف ، وعليه فالأفضل في تقدير الرطوبة بالتجفيف أن يطلق عليها الفقد بالتجفيف Drying Loss ، وأفضل أواني تقدير الرطوبة ما صنعت من النيكل أو الصلب عديم الصدأ Stainless Steel ، ذات غطاء ، ومحفور عليها أرقام لتمييزها عن بعضها أثناء التحليل ، إلا أن استخدام البواتق البورسلان Porcelain Basins يختصر الوقت ، إذ بعد وزنها بعد التجفيف يمكن ترميدها مباشرة لتقدير الرماد . ولسهولة وإسراع فقد الرطوبة تنشر العينة على مساحة قاع الطبق أو

البوتقة . يجب إجراء كل التقديرات على فرن واحد وتحت نفس الظروف ، حتى تتلاشى أخطاء الجهاز من وجود تفريغ أو تقليب للهواء أو خلافه من عدمه .

المواد الرطبة أو الهيجروسكوبية تنشر على مادة حاملة Carrier Material ، لسهولة التجفيف ، بزيادة مساحة السطح المعرضة للتجفيف ، وأفضل هذه الحوامل هي الرمل المغسول بالحامض ، والسليت Acid - Washed Sand and Celite .

تقدير الرطوبة الفعلية (الحقيقية) يتم بطريقة Karl Fischer التي تتوقف على التفاعل ما بين اليود وثاني أوكسيد الكبريت في وجود الماء ، وتتم المعايرة بالنظر أو كهربياً ، والأخيرة أكثر ملاءمة ودقة ، إلا أنها تحتاج أجهزة مكلفة ، ويحتاج محلول كارل فيشر للمعايرة اليومية للوقوف على كفاءته .

المحتوى الرطوبي لبنجر السكر يمكن استنتاجه من صفات أخرى تحت ظروف معينة ، يمكن حساب الرطوبة لمحاليل السكر من كثافتها أو دليل الرفراكتومتر أو من التحويل الضوئي لها .

تقدير الرطوبة بالأجهزة الكهربية لم يلق قبولاً كبيراً ، وهي تعتمد في قياسها على صفات منها المقاومة Resistivity ، والثابت الكهربي Dielectric Constant ، والأولى أرخص لكنها لا تقدر الرطوبة البسيطة ، بينما الثانية معقدة وأغلى ، وهي عموماً تناسب التقدير الاختباري الأولي السريع .

هذا ويجب أن يكون الفارق بين كلا التقديرين (مكررين) لا يتعدى ٢,٠ ٪ . ويلاحظ عند تقدير رطوبة قشر البيض أن يزال أي بياض أو أغشية ، وفي تقدير رطوبة اللحم فتجفف على رمل لمدة ١٤ ساعة على ١٠٥°م ، أما رطوبة البيض فتقدر بذوبانه في أسيتون وتبخير الأسيتون ثم تجفيف القابلة وحساب الفرق في وزنها .

وما يطلق عليه ماء خام مقدر على ١٠٣°م لمادة ما ، يكون مصحوباً بفقد كل من :

أ ـ مــاء .

ب ـ أحماض دهنية طيارة (حمض خليك ، حمض بيوتريك ، حمض اللاكتيك في السيلاج) .

جـ ـ مواد طيارة أخرى (إثير ، زيوت ، كحول) .

وعليه فالمادة الجافة على ١٠٣°م هي الجزء من المادة الغذائية غير الطيارة (مادة طازجة ـ ماء خام) وتحتوي المواد المعدنية والعضوية .

ويجري تقدير المحتوى الرطوبي بالتجفيف على درجات حرارة ومدد مختلفة ، حسب تركيب المادة الغذائية ، إما تحت الضغط العادي ، أو تحت تفريغ ، أو بالغلي مع سائل عضوي لا يمتزج بالماء ، ثم تقطير الماء مع هذا السائل الذي تكون درجة حرارة غليانه

أعلى من درجة غليان الماء ، أو بطرق سريعة باستخدام خاصية التوصيل الكهربائي أو التأين الكهربي ، أو بطرق تتوقف على الفاعلية الكيماوية للماء مع مركبات معينة .

١ ـ التجفيف بالحرارة :

وأهم وأبسط طرق قياس الرطوبة في المواد الغذائية هي استخدام التجفيف بالحرارة في أفران التجفيف بإحدى طريقتين :

أ ـ التجفيف على درجة حرارة ١٠٣-١٠٥°م لمدة ٤-٦ ساعات (أو ثبات الوزن) .

ب ـ التجفيف على درجة حرارة ١٣٥°م لمدة ساعتين (أو ثبات الوزن) .

وأساس هذه الطريقة هو رفع ضغط بخار الماء في الغذاء ، وصعوبتها هي أن ضغط بخار الماء في العينة يتناقص باطراد كلما استمرت عملية التسخين ، وذلك لتركيز المواد الذائبة باستمرار ، وكذلك من الصعوبات هي تعدد صور الماء في العينة ، وكل صورة لها ضغط بخار خاص ، وأن طرد ماء الادمصاص من سطوح الغرويات بهذه الوسيلة صعب ، كذلك هناك صعوبات راجعة للخاصية الهيجروسكوبية للأعلاف الغنية بالسكر ، وكذلك سهولة هدم بعض السكريات على درجة حرارة ٨٠-١٠٠°م ، كما يصعّب هذه الطريقة وجود أوكسجين الهواء أثناء التسخين ، إذ تتأكسد بعض المكونات كالتانينات ، كما يصاحب فقد الماء بالتجفيف على حرارة عالية تطاير المكونات الطيارة كالكحول والزيوت الطيارة ، كما تحتفظ بعض المواد بماء تبلورها تحت ظروف مختلفة ، وقد تحدث حالة جفاف سريع في السطح الخارجي أي عملية تقسية Hardening لبعض الأغذية ، مما يعيق سرعة تحرك الماء من الداخل .

فعملية التجفيف أو طرد الماء بالتسخين تحدث نتيجة انتقال حالة التوازن بين سطوح الغرويات والماء إلى حالة جديدة من التوازن ، ويتوقف هذا الانتقال على الحرارة والضغط الجوي ومدة التسخين .

ويجرى التجفيف بالحرارة كالتالي :

١ ـ ثبت أوزان زجاجات الرطوبة أو أطباق الرطوبة (ألومونيوم ـ صلب لا يصدأ) بغطائها نظيفة ثم بردها في مجفف ، ثم زنها فارغة .

٢ ـ ضع بها ٢-٥جم مادة غذائية مطحونة ، وحرك العينة بالطبق لتوزيعها في قاع الطبق ، ثم زن الطبق بالغطاء بالعينة .

٣ ـ ضع العينة بالطبق بالغطاء في فرن ، مع نزع الغطاء ووضعه بجانب الطبق وجفف على ١٣٥°م ، إن لم تحتو العينة مواداً طيارة يخشى تطايرها ، وإلا فتوضع على ١٠٣-١٠٥°م . في الحالة الأولى تجف العينة بعد ساعتين تقريباً وفي الثانية بعد ٤-٦ ساعات ، والأفضل أن تخرج الطبق بعد المدد المذكورة وتبرده في مجفف وتزنه ثم تعيده

٣٠–٤٥ دقيقة للفرن ، ثم تزنه وهكذا حتى ثبات الوزن .

وإن كان ينصح بأن يكون التجفيف على ١٠٣°م لمدة ٤ ساعات ويكرر استمرار التجفيف، حتى ثبات الوزن لاستخراج ٪ رطوبة على أن يجرى التقدير مزدوجاً وألا يزيد الفارق بين التقديرين عن ٠,٢ ٪ وأن تكون الوزنات لدقة ١ مجم .

وتكون المادة الجافة مساوية للمادة الطازجة مطروحاً منها الماء .

وتكون النسبة المئوية للرطوبة = (وزن العينة الطازج – الوزن الجاف للعينة) × ١٠٠ / وزن العينة الطازج

وذلك في حالة عدم التجفيف الأولى ، أما إذا جففت العينة أولياً في حالة الأغذية الخضراء على ٦٠–٨٠°م لمدة ١٢ ساعة على الأقل ، ثم تقدير الرطوبة الثانوية في العينة المطحونة والمجففة أولياً فتحسب فيها النسبة المئوية للرطوبة (الكلية) كما يلي :

٪ رطوبة كلية = ١٠٠ – (الوزن الجاف تماماً المأخوذ بعد الجفاف الأولى × الوزن بعد التجفيف الأولى / الوزن الجاف أولى المأخوذ للجفاف التام × الوزن الطازج المأخوذ للتجفيف الأولى) × ١٠٠

٪ رطوبة كلية = ١٠٠ – وزن العينة الجافة أولياً (١٠٠ – ٪ رطوبة ثانوية) / وزن العينة الطازجة

ويطلق على الرطوبة الثانوية كذلك الرطوبة المتبقية وتقدر كعاليه أي على ١٠٣°م لمدة ٤–٦ ساعات أو ثبات الوزن .

٢ـ الرطوبة الحقيقية :

والتجفيف بالفرن يقوم بطرد الماء الحر الممتص في المادة علاوة على ماء التبلور ، كما يقوم بطرد ماء ومواد أخرى ناتجة عن تفاعلات كيماوية ، مما يؤدي إلى نتائج خاطئة؛ لذلك فهناك طرق أخرى لتقرير الرطوبة في المواد الغنية بالمركبات الطيارة ، تفصل الماء الحقيقي بالغليان مع سوائل درجة غليانها أعلى من درجة غليان الماء (كالزيلين ١٣٩°م أو التوليوين ١١٤°م) لمدة ١٥–٣٠ دقيقة مع المحلول الأول أو الثاني على الترتيب ، وتجميع الماء في أنبوبة مدرجة ، ونظراً لاشتعال الزيلين والتوليوين فإنه يستخدم رباعي كلوريد الإيثان (١٤٠°م) دون اشتعال . وهذه الطريقة أنسب لتقدير المادة الجافة في السيلاج إذ أن استخدام التجفيف (حرارة الفرن) لتقدير المادة الجافة في السيلاج أدى إلى فقد بلغ حتى ١٦٪ مقارنة بتقديرها بتقطير التولوين ، وتتوقف نسبة الفقد في المادة الجافة على درجة حرارة التجفيف (٤٠–١٠٠°م لمدة ٤٨ ساعة) ومحتوى السيلاج من الأحماض العضوية . ويعيب هذه الطريقة إمكانية تكوين مستحلب مع الماء والتولوين أو الزيلين ، كما تلتصق قطرات الماء على جدار الأنبوبة المدرجة إذا لم تكن تامة النظافة .

٣ ـ الطرق الأخرى للرطوبة :

وخلاف التجفيف بطرقه المتعددة ، واستخدام تقطير المذيبات ، فهناك طرق أخرى عديدة كيماوية وطبيعية وكهربية .

فمن الطرق الكيماوية السريعة لتقدير المحتوى الرطوبي: طريقة كارل فيشر Karl Fischer ، والتي تعتمد على تفاعل الماء مع اليود وثاني أوكسيد الكبريت في وجود البيريدين ، وبها يقدر الماء الحر وماء الأدرتة ، كما يمكن تقدير ماء الأدرتة فقط بعد تجفيف العينة من الماء الحر ، بالخلط مع كحول الميثايل الجاف ثم ينقط بمحلول كارل فيشر .

ومن الطرق الكيماوية كذلك بجانب طريقة كارل فيشر ، طريقة تعتمد على تفاعل الماء مع كاربيد الكالسيوم لإنتاج استيلين ، ويقدر المحتوى الرطوبي من الفقد في الوزن أو من زيادة الضغط الناتج . وطريقة ثالثة سريعة بالتنقيط بكبريتات الحديدوز بعد الأكسدة بثاني الكرومات .

ومن الطرق الطبيعية السريعة استخدام قياس التوصيل الكهربي للعينات ، أو الطرق اللونية الكهروضوئية ، وكذلك التسخين بالأشعة تحت الحمراء دون تغيير في التركيب الكيماوي للعينة ، بل دون ملامستها ، فبالإشعاع بهذه الأشعة يقدر بالتالي الفقد في الوزن في العينة كنسب مئوية نتيجة فقد الرطوبة .

ولتقدير الرطوبة في التربة تؤخذ وزنة معلومة من التربة الجافة هوائياً ، تجفف في فرن كهربائي على درجة حرارة ١٠٥–١١٠ْم لمدة ١٦–٢٤ ساعة ، أعد الوزن فالفرق يعبر عن كمية الماء المفقود الذي ينسب لوزن الأرض الجاف تماماً كنسبة مئوية للرطوبة .

ولتقدير الرطوبة في البيض ، فيمكن أن تقدر في القشرة بنزع الأغشية عن القشرة لإزالة أي بياض قد يعلق بالقشرة ، ثم تؤخذ وزنة وتجفف على ١٠٥ْم لمدة ٤ ساعات أو حتى ثبات الوزن .

ولتقدير الرطوبة في البياض أو الصفار يضرب حتى التجانس ثم يؤخذ ١٠جم عينة في دورق مستدير سعة ٢٥٠ مل جاف جيداً ومعلوم وزنه ثم تذاب العينة في ٥٠ مل أسيتون ، بخّر الأسيتون على حمام مائي ساخن وكرر إضافة الأسيتون والتبخير مرتين أخريين ، ثم جفف الدورق في فرن وأعد وزنه واحسب ٪ رطوبة من الفقد في الوزن .

٤ ـ المواد الصلبة (الجافة) :

تقاس المواد الصلبة الذائبة بالنسبة المئوية للمتبقي من منقوع العينة مع الماء ، والطرد المركزي للمنقوع وتجفيفه ، أو تقاس المواد الصلبة الذائبة كذلك Total Soluble Solids من قراءة العينة على الرفراكتومتر . أمّا المواد الصلبة الكلية Total Solids فتقدر بنسبة المتبقي من العينة بعد وضعها في كأس قاعها مستوٍ وتجفيفها حتى ثبات وزنها . أما المواد الصلبة غير

الذائبة Water Insoluble Solids فتقدر بوزن عينة معلومة ، وإضافة مقدار ماء إليها ، والغليان بشدة لمدة ساعة ، ثم برد ورشح واغسل الراسب جيداً بالماء ، ثم جففه حتى ثبات وزنه ، فيمثل المواد الصلبة غير الذائبة .

ولتقدير جوامد الصفار Egg Yolk Solids استخلص ١٠جم عينة في جهاز سوكسلت بواسطة ١٠٠ مل من الميثانول النقي لمدة ساعتين ، واسحب الميثانول وأضف ١٠٠ مل أخرى ، وكرر الاستخلاص ساعتين أخريين . اجمع الميثانول وبخره حتى الجفاف ثم اجر عليه تقديراً للفوسفور ($P_2 O_5$) بعد الأكسدة الرطبة (كما سبق ذكره) واستنتج كمية الجوامد بصفار البيض وكذلك كمية البيض الجاف Dried Egg كالتالي :

جوامد الصفار = فو٢ أ٥ × ٥٦

بيض جاف = جوامد صفار البيض X ١,٤٨ .

ولتقدير المادة الجافة في اللبن (أو الجوامد الكلية كنسبة مئوية) يثبت وزن أطباق رطوبة بها ورق ترشيح ، ثم يوضع ١٠جم لبناً لتمتصها أوراق الترشيح ، وتجفف على ٦٠°م حتى يجف اللبن ، ثم على ١٠٢°م لمدة ٣ ساعات ، لعدم تكربن اللبن لو زادت الحرارة عن ١٠٢°م .

كما تقدر المادة الجافة ٪ (جـ) للبن بمعلومية كثافته (ث) ، ونسبة دهنه (د) ، حيث إن :

$$\text{جـ} = ١,٢ \text{ د} + \frac{\text{درجة اللبن}}{٤} + ٠,٢٥$$

حيث درجة اللبن عبارة عن ثاني وثالث رقم عشري من الكثافة بينما الرقم العشري الرابع عبارة عن كسر درجة اللبن ، فمثلاً اللبن الذي كثافته ١,٠٣٣٧ درجته عبارة عن ٣٣,٧ .

ومن معادلة ريتشموند Richmond :

جـ = ٠,٢٥ ث + ١,٢٢ د + ٠,٧٢

وإذا قرأ اللاكتومتر على درجة حرارة تختلف عن ٢٠°م ، فتصحح الكثافة بإضافة ٠,٠٢٤ لكل ١°م أعلى من ٢٠°م .

ومعروف أن كثافة اللبن تتوقف على محتواه الدهني والمائي وجوامده غير الدهنية .

ويتباين محتوى الماء في السمك باختلاف المواسم وطبقاً لدورة التناسل ، إذ يرتفع (٢-٣٪) بعد التبويض مع انخفاض قيم PH مما يجعل السمك غير صالح للتجميد ، إلا أن هذه الحالة لا تستمر إلا مدة بسيطة في موسم الربيع .

وفي السمك الدهني يرتبط المحتوى الدهني بالمائي ، فيمكن تقدير أحدهما بمعلومية

الثاني .

ويقدر المحتوى المائي بطرق عديدة من بينها التجفيف الحرارى تحت ظروف تحد من فقد المواد الطيارة الأخرى (سواء الطبيعية أو الناتجة من الهدم الحراري) أو الأكسدة ، وذلك على ١٠٣°م حتى ثبات الوزن مع تجنب تكوين قشرة خارجية تحول دون تبخير الماء وذلك بالخلط الجيد مع الإسبستوس أو الرمل سابق التجفيف .

ولتقدير المادة الجافة للحم تجفف بوتقة بها ٥٠جم من الرمل النظيف على درجة حرارة ١٢٠°م لمدة ساعة ، ثم تبرد في مجفف ويوضع بها حوالي ٦جم من اللحم الخالي من الدهن فوق الرمل دون ملامسة اللحم لجدر البوتقة ، وتوزن وتجفف على ١٠٥°م لمدة حوالي ١٤ ساعة ويعين الوزن الجاف المتبقي من اللحم بعد أن تبرد في مجفف ، وينسب إلى الوزن الطازج مضروباً في ١٠٠ لاستخراج ٪ مادة جافة .

أما الجوامد الكلية للبول فيتم تقديرها بأن يوضع ٥ مل بول في طبق ضحل موزون ، وتحمض بنقط قليلة من حمض الخليك ، وتجفف تحت تفريغ (في وجود حمض كبريتيك) حتى ثبات الوزن احسب النسبة المئوية للمواد الصلبة في عينة البول ، وعبر عنها كجوامد كلية في بول ٢٤ ساعة .

تقل الجوامد الكلية في حالات التهاب الكلى لإعاقة الإخراج ، بينما تزيد الجوامد الكلية في حالة زيادة إخراج السكر (مرض السكر) .

وقد تستنتج الجوامد الكلية من الكثافة النوعية للبول ، إذ تضرب ثاني وثالث رقم عشري للكثافة النوعية في ٢,٦ لاستنتاج عدد جرامات المادة الصلبة / لتر بول (وإن أوقف استخدام ذلك الآن) .

مراجع يمكن الرجوع إليها :

– عبد القادر راشد أبو عقاده ، مصطفى محمد أبو النجا (١٩٧٠) : طرق التحليل الغذائي ـ دار المعارف بالأسكندرية .

– كاظم مشجوت عواد (١٩٨٦) : مبادئ كيمياء التربة – جامعة الموصل .

– محمود إبراهيم فهمى (وآخرون) : تجارب عملية فى أساسيات علم الأرض – دار المعارف بمصر (١٩٦٥) .

- Close, W. & Menke , K. H. (1986) Selected topics in animal nutrition . Deutschestiftung für Internationale Entwicklung , Feldafing, Germany .

- Egan, H. etal . (1981) Pearson's Chemical Analysis of Foods . 8 th

Ed ., Churchill Livingstone, Edinburgh & London .

- Gruenwedel, D. W. and Whitaker , J. R. (1985) Food Analysis, Vol. 3 , Marcel Dekker, N . Y.
- Leitgeb, R. (1979) Futtermittelkunde, Vorlesungen, Univ . F. Boku, Wien.
- Meyer, H. et al (1980) Supplemente zu volesungen und übungen in der Tierernährung . 5 . Auflage , Sprungmann Verlag, Hannover .
- Minson , D. J. & Lancaster , R. J. (1963) N. Z. J . Agric . Res ., 6 : 140 .
- Official Methods of Analysis of the AOAC (1965), 10 th Ed . Washington .
- THe Feeding stuffs (Sampling and Analysis) Regulations (1982) Agriculture (1982) No. 1144 . Her Majesty's Stationery Office, Londen .

الفصل الثاني
الدهـــون

وهي مجموعة غير متجانسة من المواد التي تذوب في الداي إيثايل إيثير ، وتعرف بالمستخلص الإيثيري ، وتشمل بجانب الدهون الحقيقية (المتعادلة أو البسيطة) ، كذلك ليبيدات أو دهون معقدة ، مثل الفوسفوليبيدات ، والإستيرويدات ، والكاروتينويدات ، ومواد أخرى مشابهة، وكلها تشترك في ذوبانها في مذيبات الدهون ، سواء كحول إيثايل ساخن، كلوروفورم ، رابع كلوريد كربون ، أسيتون ، إثير ، إثيربترولي وغيرها . ويجرى استخلاصها بأحد المذيبات المذكورة ، أو بالمعاملة بالقلوي الساخن ، ثم التحميض بحمض معدني .

ولاستخلاص الدهن بالمذيبات قد يجرى على العينة الجافة تماماً Dry Extraction بمذيب لا مائي Anhydrous ، أو على العينة غير الجافة Wet Extraction ، وفي الاستخلاص الجاف يستخدم عادة إيثر بترولي ، حيث لا يتأثر بالكميات البسيطة من الرطوبة المتبقية في العينة ، أما الإيثير العادي فإن لم يكن تام الجفاف وخالي الماء والكحول فإنه يستخلص بعض السكريات وغيرها من العينة . أما الاستخلاص الرطب باستخدام الأحماض فيستخدم لتكسير مستحلب الدهن ، نتيجة وجود غلاف بروتيني حول حبيبات الدهن (كما في اللبن) ، فيسهل استخلاص الدهن بتحريره بتكسير المستحلب .

وترجع أهمية دراسة نسبة وصفات الزيت أو الدهن في المواد الغذائية إلى قيمتها الغذائية. ويقدر الدهن الخام بطرق منها :

١ ـ الاستخلاص في جهاز سوكسلت لمدة ٣-١٦ ساعة (حسب نوع المذيب والمحتوى الدهني) باستخدام الإيثير البترولي :

فتوزن ١٠ جم تقريباً من العينة الجافة المطحونة على ورقة ترشيح ، وتوضع العينة بورقة الترشيح في كستبان الجهاز ، سد الكستبان بورق ترشيح ، واملأ جسم الجهاز بالمذيب حتى ينخفض في القابلة عن طريق السفون ، واستمر في إضافة المذيب حتى منتصف الجسم (حوالي ١٥٠ مل)، وضع المكثف ، واستخلص لمدة حسب المحتوى الدهني (في المتوسط ١٢ ساعة) ، تخلص من المذيب ثم جفف القابلة على ١٠٠°م لمدة ساعة أو على ١٠٥°م لمدة نصف ساعة ، برد في مجفف ، ثم زنها نظيفة جافة ، فالزيادة في وزن القابلة هو وزن الزيت أو الدهن ، فيحول كنسبة مئوية من وزن العينة الأصلي ويلاحظ أنه يمكن إجراء التقدير في العينة الطازجة ، وبمعرفة نسبة الرطوبة في العينة فيمكن حساب نسبة الدهون على أساس الوزن الجاف ، وأنه كلما كان معدل تكثيف المذيب سريعاً كلما

قصرت فترة الاستخلاص ، في حالة انخفاض المحتوى الدهني فيؤخذ وزن أكبر من العينة الجافة (في حدود ١٠٠ جم) ، وتستخلص على البارد في زجاجات واسعة الفتحة لمدة ٧٢ ساعة مع الرج المتكرر ثم يؤخذ الراشح ويستخلص منه الدهون في جهاز سوكسلت .

ويجب أن يكون الفارق بين مكررتي تقدير الدهون الخام لا يتعدى ٠,٣ ٪ دهن .

٢ ـ التحليل المائي قبل استخلاص الدهون (كما في السمك) :

وفي هذه الطريقة يؤخذ ٥ جم عينة ، وتقلب جيداً مع ١٠٠ مل ماء مقطراً مع ٦٠ مل Hcl مدخناً مع إضافة حجر خفاف ، والتسخين ببطء حتى يصل للغليان ، مع التغطية بزجاجة ساعة ، يترك للغليان ٣٠–٦٠ دقيقة . يضاف ٥٠ مل ماءً مقطراً ساخناً ، ثم يرشح على ورق ترشيح مبلل ، فإن صعب الترشيح يعاد التحليل المائي بالحامض . يغسل الراسب جيداً بالماء المقطر الدافئ حتى تعادل الراشح . جفف ورقة الترشيح بالراسب على ١٠٥°م لمدة ٢–٤ ساعات ، ثم ضعها في كستبان جهاز سوكسلت ، واستخلصها بالداي إيثيل إيثير . ونفس درجة الدقة بين المكررات يجب ألا تتعدى ٠,٣ ٪ دهن . وفي هذه الطريقة الأخيرة يلاحظ أنه في المواد الغذائية الغنية بالدهون ، وكذلك المواد التي يظهر الدهن في راشحها بعد التحليل بالحامض ، فإنه يفضل معها استخلاص الدهن الخام الذائب في الداي إيثيل إيثير قبل تحليلها بالحامض ، وللاحتياط من فقد الدهن خلال الترشيح فإنه يستخدم ورقتي ترشيح معاً في آن واحد . وتستخدم طريقة التحليل بالحامض المعدني هذه (Weibull - Stoldt Method) Werner Schmid Method مع الأغذية ذات الأصل الحيواني الغنية بالبروتين لتحرير الدهن؛ لأن طريقة سوكسلت تعطي مع مثل هذه المواد نتائج منخفضة .

يؤدي تقدير الدهن بثاني إيثيل الإيثير أو الإثير البترولي بعد أو بدون تحلل مائي بحمض الهيدروكلوريك إلى فروق في المحتوى الدهني للأعلاف ولحساب محتوى الدهن في أعلاف المجترات تستخدم المعادلتان الآتيتان (جم / كجم مادة جافة) :

للأعلاف الخشنة: قيمة الدهن بتحليل بالحامض ثم بالإيثير البترولي= ٣,٠٤+٠,٩١١ قيمة الدهن بثاني إيثيل الإثير .

وللأعلاف المركزة : قيمة الدهن بتحليل بالحامض ثم بالإيثير البترولي == ٤,٠٢+٠,٩٧٤ قيمة الدهن بالتحليل بالحامض ثم بثاني إيثيل الإيثير .

٣ ـ استخلاص المواد الغنية بالسكر :

مع المواد الغنية بالسكريات تستخدم طريقة Rose Gottlieb لتقدير الدهون باستخدام الكحول والأمونيا لترسيب وإذابة البروتينات على الترتيب فيوزن ١٠ جم عينة في الأنبوبة + ١ مل أمونيا واخلط ثم أضف ١٠ مل كحول (٩٥ ٪) واخلط ثانية ، أضف ٢٥ مل داى

إيثيل إيثير ، وسد الأنبوبة ورج بشدة لمدة دقيقة أضف ٢٥ مل إيثير بترولي ورج بشدة ٣٠ ثانية . بعد تمام الفصل اسحب الدهن (بأنبوبة زجاجة غسيل) إلى دورق مناسب جاف على ١٠٠ْم وبارد وموزون . أضف للأنبوبة ٥ مل إثير ثم ٥ مل أخرى بدون رج ، انقلها للدورق لغسيل أنبوبة السيفون كرر الاستخلاص بـ ١٥ مل إثير + ١٥ مل إيثير بترولي ، وكرر ذلك مرة أخرى . بخر المذيبات من الدورق وجففه بالدهن على ١٠٠ْم ، برد وزن إذا ظهرت أي مواد غير دهنية فاغسل الدهن من الدورق بالإثير البترولي ، جفف وأعد الوزن وصحح النتائج .

٤ ـ طريقة جارتون :

ومن طرق تقدير الدهون كذلك طريقة جارتون ، وفيها يوزن ١ جم عينة في كأس ١٠٠ مل مع ٢٥ مل من مخلوط كلوروفورم : إيثانول (٢:١) ، ويوضع الكأس على حمام مائي كهربائي ، ويحسب ٢-٣ دقائق من بدء الغليان ، ويرفع الكأس ويرشح بواسطة قمع بخنر (يرشح الرائق فقط) ، وبملوق معدني يتم نقل الراسب المتبقي على ورقة الترشيح بعناية إلى الكأس مرة ثانية ، ويكرر الاستخلاص ٣ مرات بنفس مخلوط المذيبات ونفس الحجم والمدة كل مرة ، وبين كل مرة والأخرى ترشيح كما سبق . يتم الاستخلاص بعد ذلك بطريقة سوكسلت لمدة ٢٠ دقيقة ، والتجفيف على ١٠٥ْم لمدة ١,٥ ساعة وتكون نسبة الدهون كالتالي :

% Fat = 100 - [% Moisture + % Residue]

١ ـ ومن الملاحظات الواجب مراعاتها عند استخدام جهاز سوكسلت :

١ ـ سد الكستبان بورق الترشيح المطوى أو بالصوف الزجاجي .

٢ ـ تكون القابلة مغسولة جيداً وجافة حتى ثبات وزنها ، ثم تبريدها ووزنها .

٣ ـ ملاحظة مرور تيار الماء في المكثف من أسفل لأعلى .

٤ ـ استخدام حمام مائي يسخن بالكهرباء ، وعدم استخدام اللهب مطلقاً ، منعاً من اشتعال الإيثير .

٥ ـ تلاحظ تكرار عملية Syfoning ، فإن كانت بطيئة يتمم على وجود الكهرباء من عدمه ، وجود تيار ماء بالمكثف ، عدم إحكام أجزاء الجهاز ، اتجاه تيار الماء في المكثف ، وجود ماء بالحمام المائي .... إلخ .

٦ ـ ملاحظة مستوى الماء بالحمام المائي ، فإذا انخفض فزده بماء ساخن حتى يستمر غليان الإيثير بلا انقطاع (إذا زدته بماء بارد) .

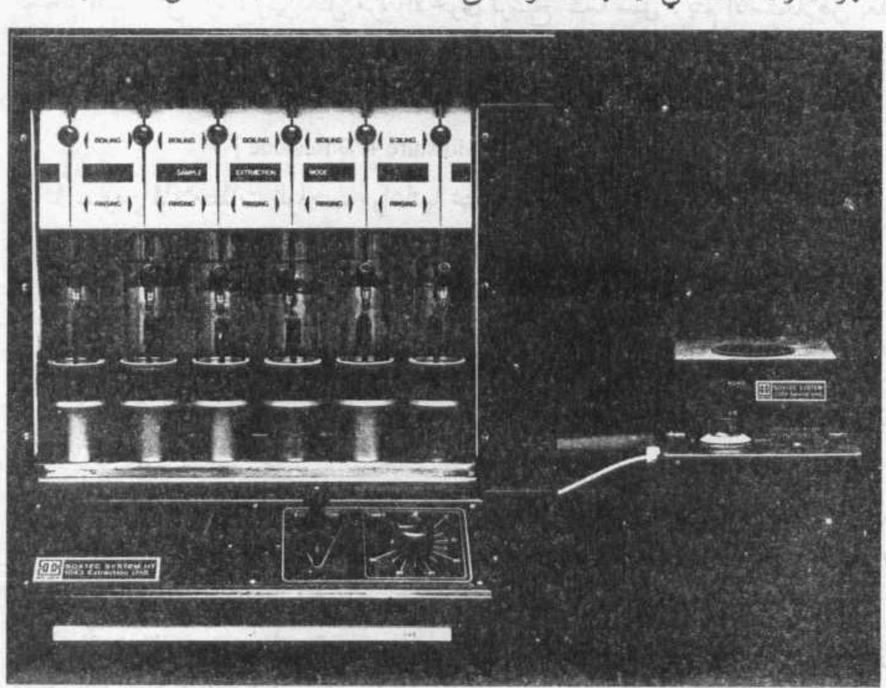
٧ ـ بعد إتمام الاستخلاص أخرج الكستبان من جسم الجهاز ، واستمر في التسخين لتجميع الإيثير من القابلة للجسم ، فيتخلص منه ، ويستمر مرة أخرى في التسخين لتجميع

الإيثير في الجسم ، حتى يبقى الدهن بالقابلة فقط ، فتفصل القابلة للتجفيف على ١٠٥°م لطرد الرطوبة الجوية ، وباقي الإيثير لمدة ١–٣ ساعات ، وتبرد وتوزن لاستنتاج وزن الدهن ونسبته .

$$\text{٪ دهن} = \frac{\text{الفرق بين وزنتي القابلة بعد وقبل الاستخلاص} \times ١٠٠}{\text{وزن العينة}}$$

٨ ـ قد يستخدم بدلاً من الإيثير البترولي خليط بنسب متساوية من الإيثير البترولي مع الداي إيثيل إثير ، أو يستبدل ذلك الخليط بالكلوروفورم .

وعادة في الأغذية الغنية بالدهون تستنتج محتواها الدهني بطرح باقي المكونات من ١٠٠ لحساب النسبة المئوية للدهن . ويحسن تجفيف الدهن المستخلص على ٧٠° م لمدة ١٦ ساعة بدلاً من الحرارة الأعلى . وعند الاستخلاص للدهن بالرج مع المذيبات ونقل المذيب المستخلص لإناء سابق وزنه ، فقد يتكون مستحلب هذا المستحلب يمكن تكسيره بالطرد المركزي . وهناك أجهزة حديثة لتقدير الدهن بنفس فكرة سوكسلت يتم فيها استخلاص عديد من العينات في آن واحد وفي وقت قصير جداً ٣٠–٦٠ دقيقة وهناك أجهزة أخرى تعتمد في قياسها للدهون على اختلاف كثافة مخاليط الدهن / المذيب .



شكل (٣١) جهاز سوكسلت حديث

٥ ـ دهن اللبن :

تقدر نسبة دهن اللبن سواء فى اللبن الخام ، أو المبستر ، أو المجنس ، أو المحفوظ باستخدام أنابيب جربر Gerber القياسية (طول ١٩٠ م ، طول العنق ١٥ م ، العنق والجسم اسطوانى ، قطر داخلى للعنق ١١,٥ م ، حجم الجسم ٢١,٥ مل ، الجزء المدرج طوله ٧٠ م) كالتالى :

١ ـ قس ١٠ مل حمض كبريتيك مركزاً ، وانقلها إلى أنبوبة جربر ، وانقل إليها بحذر بواسطة ماصة خاصة ١١ مل لبن ، انتظر ٣ ثوان . أضف ١ مل كحول أيزوأميل isoamil alcohol ، وضع سدادة أنبوبة جربر .

٢ ـ امسك أنابيب جربر عند الجزء المدرج ، ورج حتى تمام الهضم ، ثم احذر الحرارة، وامسك عند العنق والسدادة ، واقلبها ٤ مرات على الأقل لخلط الحامض بباقى المحتويات ، ثم رقمها وضعها فى جهاز الطرد المركزى الخاص بهذه الأنابيب للطرد المركزى بسرعة ١١٠٠ لفة / دقيقة .

٣ ـ اطرد مركزيا لمدة ٤ دقائق ثم اقرأ تدريج عمود الدهن بعد وضع الأنابيب فى حمام ماء على ٧٠° م لمدة ٣ ـ ٤ دقائق ، تطرح قراءة الابتداء من قراءة الانتهاء ، وإذا زاد الفرق بين قراءتى المكررتين لنفس العينة عن ٠,١ ٪ يعاد التقدير .

هذا ويمكن تقدير الدهن فى اللبن ومنتجاته (وفى الأغذية الحيوانية) بطريقة روز جوتليب Roese - Gottlieb بالاستخلاص بالإيثير الإيثيلى ، والإيثير البترولى ، إذ يؤخذ ١٠ جم عينة + ١,٢٥ ـ ٢,٠ مل هيدروكسيد أمونيوم + ١٠ مل كحول (٩٥ ٪) ثم ٢٥ مل إيثير دى إيثيلى ، وتسد الأنبوبة المحتوية على العينة والمستخلص ، وترج بشدة لمدة دقيقة ، ثم تبرد ويضاف ٢٥ مل إيثير بترولى ، ويكرر الرج الشديد مع الحذر لزيادة الضغط الداخلى أثناء الرج . أطرد مركزياً على حوالى ٦٠٠ لفة / دقيقة ، أو اتركها تستقر لحين تكون طبقة سائلة عليا رائقة . انقل طبقة الإيثير إلى دورق موزون . اغسل السدادة بمقدارين متساويين من الإيثيرين ، وأضفهما إلى الدورق . كرر الاستخلاص للسائل المتبقى فى الأنبوبة مرتين باستخدام ١٥ مل من كل إيثير كل مرة . بخر المذيبات تماماً على سخان أو حمام مائى . جفف الدهن حتى ثبات الوزن على ١٠٠ ـ ١٠٢° م ، أو تحت تفريغ على ٧٠ ـ ٧٥° م ، أعد الوزن للدورق فالزيادة هى وزن الدهن .

كما يمكن تقدير الدهن فى اللبن بطريقة سوكسلت ، بأن تشبع أوراق آدم الجافة Adam's Paper (بدلاً من الكستبان) بكم معلوم من اللبن ، ثم تجفف هوائياً ثم فى فرن على ٦٠° م لمدة ساعة ، ثم على ١٠٢° م لمدة ٣ ساعات ، ثم تستخدم فى الجزء الأوسط من الجهاز بدلاً من الكستبان ، ويقدر الدهن بالطريقة العادية بالاستخلاص بالإيثير .

٦ - الدهون فى البيض والأنسجة الحيوانية :

يقدر دهن البيض بالاستخلاص فى كلوروفورم / إيثانول (١/١) كالتالى :

١ - يؤخذ ١٢ مل بيضاً كاملاً سائلاً (٥ مل صفاراً سائلاً) فى دورق معيارى١٠٠ مل + ٢٥ مل مخلوط مذيبات (كلوروفورم / إيثانول) ورج ثم أضف ٦٠ مل أخرى من مخلوط المذيبات . رج كل ٥ دقائق لمدة ساعة . أكمل إلى العلامة . اتركه حتى يروق (الألبيومين السائل يؤخذ ٦٠ مل عينة ، وتوضع فى حمام بخار ، ثم تجفف فى فرن لمدة ٩٠ دقيقة على ٩٨ - ١٠٠ ° م ، برد وزن ٥ جم مادة صلبة فى دورق معيارى ١٠٠ مل وعامله كما سبق) (وفى حالة منتجات البيض الجافة يؤخذ ٣ جم بيضاً كاملاً ، أو ٢ جم صفاراً ، أو ١٠٠ جم البيومين) .

٢ - يؤخذ ٥٠ مل من الرائق للمذيبات فى كأس وتبخر حتى الجفاف على حمام بخار، ثم تجفف ١٥ دقيقة على ٩٨ - ١٠٠ ° م .

٣ - أذب المتبقيات فى ١٠ مل كلوروفورم ، ورشحها خلال سدادة من الصوف والقطن فى ساق قمع إلى كأس ١٠٠ مل جافة موزونة ، واغسل بمقدار ١٠ مل كلوروفورم أخرى . جفف ٩٠ دقيقة ، وأعد الوزن ، واحسب كمية الدهون .

ويلاحظ أنه يمكن الاستخلاص بجهاز سوكسلت للمنتجات الجافة مع استخدام مخلوط مذيبات من الكلوروفورم والإيثانول .

كما يمكن التحليل المائى بالحامض أولا ، إلا أن قيم الدهن المستخلصة بهذه الطريقة حوالى ٩٠ ٪ من قيم الدهن المقدرة مباشرة بالاستخلاص بمخلوط الكلوروفورم / إيثانول .

وقد يتم التحليل المائى بالحامض للبيض أو اللبن أو مواد العلف أو السمك وخلافه ، بوضع ١٠ جم عينة فى أنبوبة مع ١٠ مل حمض هيدروكلوريك مركزاً ، ثم تغمس الأنبوبة فى حمام ماء لإزالة البروتين ، ويتحول لون العينة إلى البنى ، ويتجمع الدهن على السطح. برد الأنبوبة تحت ماء جار ، واستخلص الدهن بأى من الطرق المختلفة ، وابسطها بالرج مع ٣٠ مل دى إيثيل إيثير فى قمع فصل ، ونقل المستخلص إلى دورق سبق وزنه . وتساعد عملية الفصل بإضافة قليل من الكحول . كرر الاستخلاص ٣ مرات ، مع جمع المستخلص كل مرة ، وتجفيف الدهن على ١٠٠ ° م . برد وزن لحساب وزن الدهن .

كما قد يقدر دهن البيض كذلك بطريقة روزجوتليب (ويقدر الليسيثين بضرب محتوى الفوسفور فى ٢٥,٥).

وقد يقدر الدهن فى الأنسجة الحيوانية (مخ ، كبد ، عضلات ، بلازما ...) بتجنيسها مع مخلوط مذيبات من الكلوروفورم والميثانول (١/٢) ، ثم غسيل المستخلص هذا (بمقدار ٢٠ ٪ من حجمه) بالماء أو محلول ملحى ، فتنتقل الدهون الخام الكلية إلى الطبقة السفلى،

وتهمل الطبقة العليا بسحبها بماصة .

والدهن فى السمك : يختلف محتواه فى عضلات السمك حسب التغذية والموسم والنوع . وتتركز الدهون فى اللحم الأحمر والبطن .

ويتكون دهن العضلات من مخلوط معقد من دهون متعادلة (جلسريدات ثلاثية) ، ودهون قطبية أو بولارية (فوسفوليبيدات) ، ومركبات أقل (ستيرولات ، وأسترات استيرولات، وأحماض دهنية حرة وخلافه) . ونسبة كل من هذه المركبات تتوقف كذلك على نوع السمك والموسم .

ويقدر المحتوى الدهنى فى عضلات السمك بالتجفيف والتحليل بالحامض ثم الاستخلاص بالهكسان أو الإيثير البترولى ، أو قد تهضم بالحامض وتطرد مركزياً للفصل الكمى ، أو تستخلص سريعاً بالأسيتون أو مخلوط الكلوروفورم والميثانول أو مخلوط كلوروفورم/ ميثانول / ماء (١,٨/٢/٢) .

ويقدر دهن السمك بأخذ مستخلص السمك وخلطه مع كلوروفورم وميثانول وماء (١٠ : ١٠ : ٨) ثم يطرد مركزياً وتؤخذ طبقة الكلوروفورم (أو جزء منها) فى كأس جاف موزون ويبخر ويعاد تجفيفه ووزنه لمعرفة وزن الدهن .

٧ ـ الدهون الكلية فى الدم والأنسجة :

يعامل الدم بمانع تجلط (EDTA) ثم يؤخذ منه ٠,١ مل + ٣ مل حمض كبريتيك مركزا، ويخلط ١٠ ثوان ، ثم يوضع فى حمام ماء يغلى ١٠ دقائق ، ثم تبرد الأنابيب . يجرى نفس الشىء على محلول قياسى (٨جم/لتر مخلوط استرات أحماض دهنية غير مشبعة) . يؤخذ ٠,١ مل من كل من العينة والمحلول القياسى ، وكذلك من حمض كبريتيك مركز (بلانك) فى ٣ أنابيب مختلفة ، ويضاف إلى كل منها ٣ مل دليل (٨٠٠ مل حمض فوسفوريك/لتر فيه ١,٢ جم ڤانيلين/لتر) . اخلط ١٠ ثوان واترك الأنابيب فى ظلام ٣٠ دقيقة ، ثم قدر الكثافة الضوئية (ثابتة لمدة ٢٠ دقيقة) على ٥٢٥ نانومتر

$$\text{واحسب تركيز الدهون الكلية جم/لتر} = \frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٨}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسى}}$$

وتزيد دهون الدم الكلية إما لزيادة الدهون الحقيقية ، أو لزيادة الكوليسترول ، أو لعرض كلوى، أو لالتهاب البنكرياس ، أو لتليف الكبد الصفراوى ؛ بينما تقل دهون الدم لاضطرابات الامتصاص للدهن ، أو لنقص التغذية أو لفشل البنكرياس .

وتستخدم نفس طريقة السلفوفوسفوڤانيلين لتقدير الدهون الكلية فى الأنسجة ، اعتماداً أيضاً على قدرة نواتج ميتابوليزم الليبيدات غير المشبعة على التفاعل مع دليل الفوسفوڤانيلين وإنتاج معقد ملون تتناسب شدة لونه مع تركيز الليبيدات الكلية ، فيتم تجنيس ٠,١ جم من النسيج فى ٥ مل مخلوط ميثانول / كلوروفورم (١/٢) ، يؤخذ ٠,١ مل من ناتج التجانس

إلى أنبوبة اختبار جافة ، ويضاف إليها ٢,٩ مل حمض كبريتيك مركز ، اخلط جيداً ثم ضعها فى حمام ماء يغلى لمدة ١٠ دقائق ، برد أسفل تيار ماء صنبور ، انقل ٠,٢ مل من محتوى الأنبوبة الباردة إلى أنبوبة أخرى محتوية على ٣ مل دليل فوسفوڤانيلين (٤ أجزاء من حمض أورثوفوسفوريك مراكزاً مع ١ جزء من محلول مائى ٠,٦ ٪ ڤانيلين فى زجاجة قاتمة) . اخلط جيداً واتركها فى مكان مظلم لمدة ٤٥ دقيقة . عد أنبوبة مقارنة من ٠,١ مل محلول ملحى (٠,٩ ٪ ص كل) مع ٢,٩ مل حمض كبريتيك واجر عليه ماسبق كما فى العينة . عد كذلك منحنى قياسياً من عدة حجوم متدرجة (٠,١ ـ ٠,٥ مل) من محلول كوليسترول قياسى (١٠٠ مجم /١٠٠ مل كلوروفورم) وأكمل إلى ٣ مل بحمض الكبريتيك المركز ، وأكمل كما فى العينة والمقارنة . اقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة ٥٥٠ نانومتر ، واحسب تركيز الليبيدات الكلية (مجم / جم) = م × ٢٠ حيث (م) الكمية المستخرجة من المنحنى القياسى .

٨ ـ الكوليسترول Cholesterol :

١ ـ زن ١ ـ ٢ جم عينة بالضبط + ١٠ مل هيدروكسيدبوتاسيوم ٦٠٪ وترفع على حمام ماء ساخن ٣ ساعات .

٢ ـ برد وأضف إيثانول ورج ، واستخلص ٣ مرات × ٥٠ مل دى إيثيل إيثير واجمع مستخلصات الإيثير .

٣ ـ انقل المخلوط فى قمع فصل مع ١٠٠ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ١٠ ٪ ، ورج واترك لفصل الطبقات .

٤ ـ أضف ٥٠ مل دى إيثيل إيثير للطبقة المائية ، ورج وافصل واجمع طبقات الإيثير .

٥ ـ رج طبقات الإيثير المجتمعة مع ٢٥ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٢ مولر ، ثم مع ٢٥ مل حمض هيدروكلوريك ٢مولر ، ثم مرتان × ٢٥ مل ماء مقطراً . جفف طبقة الإيثير على كبريتات الصوديوم ، اغسل كبريتات الصوديوم عدة مرات بالإيثير .

٦ ـ بخر الإيثير ، أضف ٢ مل إيثير للذوبان لكل المادة غير المتصبنة ، أضف ٠,٢ مل برومين ، واترك المخلوط فى حمام ثلجى ١٠ دقائق .

٧ ـ أضف بسرعة ١٥مل حمض خليك ٨٠ ٪ ، واستمر ١٠ دقائق أخرى على حمام الثلج .

٨ ـ رشح على بوتقة جوتش Gooch Crucible ، واغسل بحمض خليك بارد كالثلج ، ثم اغسل ٣ مرات بماء بارد كالثلج ، ثم بالكحول (١٠مل) ، ثم ٤ مرات × ٥مل دى إيثيل إيثير ، ثم مرتان × ٥ مل كحول إيثانول .

٩ ـ أضف ١ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ١٠ ٪ إلى مخلوط الإيثير ـ كحول ، وبخر

حتى الجفاف .

١٠ ـ أضف ٥٠ مل ماء إلى المتبقيات ، وعادل بحمض هيدروكلوريك ٦ مولر ، ثم أضف ١٠ جم كلوريد صوديوم + ٣ جم فوسفات صوديوم + ٢٠ مل هيبوكلوريت صوديوم ، اغل ثم ابعد عن اللهب ، وأضف ببطء ٥ مل فورمات صوديوم ٥٠ ٪ .

١١ ـ برد بسرعة ، وأضف ١٠٠ مل ماء + ٥ مل يوديد بوتاسيوم ٢٠ ٪ + نقطتين موليبيدات أمونيوم ٥ ٪ + ٢٥ مل حمض هيدروكلوريك ٦ مولر ، وعاير بالثيوكبريتات صوديوم ٠,٠٢ مولر فى وجود دليل نشا طازج (١ ٪) . استنتج تركيز الكوليسترول حيث إنه = ٠,٥٥ + (٠,٦٨٨×ح) حيث ح هى حجم الثيوكبريتات المستخدمة فى المعايرة .

كما يمكن تقدير الكوليسترول بالتفاعل مع كلوريد الحديديك فى وجود حمض الخليك وحمض الكبريتيك فينتج لون أرجوانى تتناسب شدته مع تركيز الكوليسترول . فيؤخذ ٠,١ مل من البلازما وينقل إلى ٣ مل حمض خليك ثلجى فى أنبوبة اختبار جافة ، ثم يضاف إليها ٢ مل دليل لون (٢مل محلول كلوريد حديديك تركيز ١٠ ٪ فى حمض خليك ثلجى تخفف إلى ٢٠٠ مل بحمض كبريتيك مركزا) ، واخلط وقس الكثافة الضوئية على ٥٦٠ نانومتر . استخدم مقارنة من ٣ مل حمض خليك ثلجى مع ٠,١ مل محلول ملح الطعام ٠,٩ ٪ وأكمل كما فى العينة . قارن بحجوم متدرجة (٠,١ ـ ٠,٥ مل) محلول قياسى من الكوليسترول (١٠٠مجم / ١٠٠ مل حمض خليك ثلجى) مع ٣ مل حمض خليك ثلجى مع ٠,١ مل محلول ملحى مع ٢ مل دليل لون لرسم المنحنى القياسى .

٩ـ جودة الدهون :

يتواجد الدهن طبيعياً فى الأغذية بنسب متفاوتة أقلها فى الأغذية النباتية ، وتلعب نسبة الدهن فى مواد العلف دوراً هاماً من حيث قيمة الغذاء الحرارية ، بل يمتد أثرها عند زيادة نسبتها فى العليقة إلى التأثير على تركيب وكمية دهن المنتجات الحيوانية . إلا أن زيادة الدهن فى العليقة تقلل من قيمة بروتينها المهضوم لقلة القيمة الحرارية للبروتين المهضوم ؛ لذلك فإن إضافة نتائج استخلاص الزيوت من البذور الزيتية فى العلائق أفضل من إضافة الكسب ناتج العصر ، إذ إن الأول يسمح (بجانب الدهن) بأن يمد العليقة ويكملها بروتينياً . وللحكم على مواد العلف الغنية بالدهون أو على الدهون المضافة للأعلاف فإن من الأهمية بمكان تقدير النقاوة والهضم والقيمة الحرارية والطزاجة والمحتوى الدهنى وتأثير الدهن على المنتجات الحيوانية وجودتها .

وللنقاوة فى الدهون تقدر الجزء غير القابل للتصبن ، فالدهون تحتوى على جزء لا يمد العلف بطاقة ، مثل المواد الملونة ، والسترويدات ، والشموع ، والزيوت ، والدهون المعدنية ،

عكس الجليسريدات الثلاثية والفوسفاتيدات ، والأحماض العضوية التى تتصبن بالبوتاسا الكاوية الكحولية الساخنة . فالدهون الحقيقية تحتوى عادة على أقل من ٥ ٪ أجزاء غير قابلة للتصبن ، تلاحظ كذلك المحتوى المائى للدهون ، إذ إن زيادة الرطوبة ، تؤدى للتلف الميكروبى ، فلا ينبغى ارتفاع الرطوبة عن ٢ ٪ .

وتتوقف القيمة الحرارية على الطاقة الكلية والطاقة المهضومة . وتتعلق الطاقة الكلية بطول السلاسل ، ودرجة التشبع للأحماض الدهنية وهى تنحصر مابين ٣٧ ـ ٤١ ميجاچول / كيلوجرام . وتقلل الروابط المزدوجة من القيمة الحرارية للدهن بمقدار حوالى ١٢٦ ـ ٢١٠ كيلوچول/رابطة مزدوجة . وللحكم على أطوال سلاسل الأحماض الدهنية يلزم تعيين رقم التصبن ، ورقم الإستر ، وللحكم على درجة التشبع نعين الرقم اليودى .

وتعيين رقم الحموضة يوضح تحرر الأحماض الدهنية نتيجة التزنخ . ورقم البيروكسيد يوضح الأكسدة فى الروابط المزدوجة . فللحكم على طزاجة الدهن يقدر رقم الحموضة ، ورقم البيروكسيد ، ورقم الألدهيد (بنزيدين) ، والتصبن ، ورقم الإستر ، والعدد اليودى ، وفيما يلى وصف لتقدير بعض هذه الصفات فى الزيوت والدهون .

أ ـ نقطة الانصهار Melting Point :

أحد مقاييس الدهن الواجب تعيينها ، فيصهر الدهن على درجة حرارة أعلى قليلاً بعدة درجات مئوية عن درجة انصهاره ، اغمس أنبوبة زجاج شعرية دافئة فى الدهن السائل ، واسمح للعينة بالارتفاع فى الأنبوبة الشعرية . ارفع الأنبوبة بسرعة ، وامسح سطحها الخارجى وسد طرفها جهة الدهن . جمد الدهن بالتبريد فى ثلج . اترك الأنبوبة بالعينة على ١٥ ـ ٢٠ ° م لمدة ٢٤ ساعة . اربط الأنبوبة الشعرية بالدهن ملاصقة لمستودع الزئبق لترمومتر بواسطة شريط مطاط ، واغمس مستودع الترمومتر والأنبوبة الشعرية كاملة (بالدهن) فى كأس به ماء بارد ومقلب زجاجى . ارفع درجة الحرارة ببطء ودوِّن درجة الحرارة التى عندها يتشكل هلال عند سطح الدهن (وهى درجة الانصهار الأولية) ، ثم التى عندها يبدأ الدهن فى الارتفاع فى الأنبوبة (وهى درجة السيولة Slip Point) . وهاتان الدرجتان تقدران للأنابيب الشعرية المفتوحة ، أما إن كانت الأنبوبة مسدودة فتقدر درجة الانصهار وهى التى تروق فيها العينة تماماً .

ب ـ تصبن الزيوت والدهون :

يستخدم فى تحليل الزيوت مايعرف برقم التصبن Saponification Number ، وهو عدد ملليجرامات KOH اللازمة لتصبن جرام واحد من الزيت أو الدهن . وتقدر بتسخين وزن معلوم من الزيت أو الدهن مع حجم معلوم من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ذو تركيز معروف ، ثم معادلة ماتبقى من KOH (بمحلول معلوم القوة من حمض) بعد التحليل

المائى للدهن ، وهو الباقى من القلوى دون تفاعل ، وتكون عدد مكافئات الزيت أو الدهن (الإستر) مساوياً لعدد مكافئات القلوى مطروحاً منها مكافئات القلوى المتبقية (أى عدد مكافئات الحمض المستهلكة فى معادلة الزائد من القلوى) . ويفضل استخدام البوتاسا الكاوية عن الصودا الكاوية ؛ لأن فى الأولى يكون صابونها رخواً يمتزج بالماء .

الخطوات :

١ ـ زن بالضبط ٢ ـ ٣ جم عينة زيت أو دهن فى دورق مخروطى سعة ٢٥٠ مل دون تلوث الجدران ، ثم أضف إليها بالماصة ٢٥ مل محلول هيدروكسيد بوتاسيوم كحولية ٠,٥ عيارى (معلومة بالضبط) (تحضر بإذاب ٢٨جم KOH فى أقل كمية ماء مقطر ، ويترك ليبرد تماماً ، ثم يكمل بالكحل إلى لتر ، ويترك ٢٤ ساعة ، ثم يرشح فى زجاجة بنية اللون وتسد جيداً) .

٢ ـ رج الدورق جيداً ، ثم ثبت على فوهته مكثفاً عاكساً ، وسخن على حمام مائى لمدة نصف ساعة (ساعتين للشموع)، مع رج الدورق من حين لآخر حتى تمام التصبن بروائق لون المحلول تماماً واختفاء حبيبات الدهن من قاع الدورق .

٣ ـ يرفع المكثف ، ويضاف بعد التبريد نقط من دليل فينولفثالين ، ثم يعادل الزيادة من القلوى بواسطة حمض HCl ٠,٥ عيارى (معلوم العيارية بالضبط) .

٤ ـ تعاد نفس الخطوات مع عدم إضافة زيت Blank ؛ وذلك لاستبعاد أثر وجود CO_2 أو لجهل عيارية KOH بالضبط .

الحساب :

رقم التصبن = (ح١ ـ ح٢) × ع × ٥٦,١ × ١٠٠٠/ وزن الزيت بالجرام .

حيث : ح١ = حجم HCl المستعمل فى التعادل للتجربة الخالية Blank .

ح٢ = حجم HCl المستعمل فى التعادل للتجربة بالزيت .

ع = عيارية HCl .

٥٦,١ = الوزن المكافىء للقلوى .

إذ إن الفرق بين عدد مكافئات الحمض للتجربة الخالية والتجربة بالزيت يعبر عن عدد مكافئات القلوى المستهلك فى تصبن الزيت ، وتستعمل هذه الطريقة فى حالة مجهولية عيارية القلوى .

والطريقة الأخرى فى الحساب :

عند معلومية قوة القلوى ، وهنا لا تجرى تجربة خاوية Blank ،وإن كانت هذه الطريقة أقل دقة من الطريقة الأولى .

رقم التصبن = [(ح١ × ع١) ـ (ح٢ × ع٢)] × ٥٦,١ / وزن الزيت بالجرام .

حيث إن ح١ = حجم القلوى المستعمل فى التصبن .

ع١ = عيارية القلوى .

ح٢ = حجم الحامض اللازم للتعادل بعد تمام التصبن .

ع٢ = عيارية الحامض .

٥٦,١ = الوزن المكافىء للقلوى .

ورقم التصبن = رقم الإستر + رقم الحامض .

جـ ـ رقم الإستر :

ولتعيين رقم الأستر يطرح رقم الحامض من رقم التصبن ، ويعتبر رقم التصبن مساوياً لرقم الإستر إذا كان رقم الحامض مساوياً صفراً . قيمة التصبن من أهم الثوابت للزيت أو الدهن وهو مقياس لمتوسط الوزن الجزيئى للعينة ، فكلما كان رقم التصبن كبيراً ، كلما كان الوزن الجزيئى صغيراً .

د ـ رقم الحامض للزيوت والدهون (رقم الحموضة) :

Acid Value (Number)

ويعرف رقم الحامض Acid number بعدد ملليجرامات KOH اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية المنفردة الموجودة فى جرام واحد من زيت أو دهن .

والزيوت والدهون حديثة التحضير الحيوانية الأصل تكون خالية تماماً من الأحماض الدهنية المنفردة ، بينما الزيوت النباتية تحتوى على كميات بسيطة من هذه الأحماض . وتزداد كمية الأحماض الدهنية المنفردة تدريجياً بتخزينها نتيجة عمليات الانحلال ، فتكسب هذه الأحماض المنفردة طعماً ورائحة كريهتين غير مقبولة للزيوت ، وتعرف الزيوت حينئذ بأنها تزنخت .

الخطوات :

١ ـ يوزن بالضبط ٣ ـ ٥ جم زيتاً أو دهناً فى دورق مخروطى ، ويضاف إليها ٢٥ مل من الكحول أو الإيثير أو رابع كلوريد الكربون (الدهون المتجمدة أو الشموع تذاب أولاً بعد وزنها فى ٢٥ مل إثير ثم يضاف إليها ٢٥ مل كحولا ، والمذيبات يجب أن تكون متعادلة أو يعمل لها تجربة خالية Blank) .

٢ ـ يضاف نقط من دليل فينولفثالين ، ثم نقط بمحلول KOH معلوم القوة بالضبط (٠,٢ عيارى) حتى ظهور أول لون قرمزى ، يستمر بضعة ثوان بعد رج المحلول بهدوء .

ملاحظات :

أ ـ يمكن استعمال قلوى تركيز ٠,١ عيارى إذا كانت درجة الحموضة منخفضة .

ب ـ الرج الشديد يساعد على زوال اللون بعد انتهاء التعادل؛ نظراً لأن الكمية الزائدة من القلوى عن معادلة الحمض تستهلك فى تصبن الجليسريدات المتعادلة ، وبذلك يرتفع رقم الحامض وتكون نتيجة التقدير خطأ .

الحساب :

رقم الحامض = حجم القلوى اللازم للتعادل × عياريته × ٥٦,١ / وزن العينة جم .

٪ لحمض الأوليك فى العينة = حجم القلوى × عياريته × ٠,٢٨٢ × ١٠٠ / وزن العينة جم .

حيث إن ٠,٢٨٢ مللى مكافئ حمض أوليك .

٥٦,١ مكافئ القلوى

وإن عدد مكافئات القلوى = عدد مكافئات حمض الأوليك .

ورقم الحامض أو الأحماض الدهنية الحرة يعبر عنها فى معظم أنواع الزيوت والدهون كحامض أوليك ، بينما فى زيوت جوز الهند ونوى النخيل يعبر عنها كحامض لوريك ، وفى زيت النخيل كحامض بالميتيك كالتالى :

$$\text{٪ أحماض دهنية حرة كأوليك} = \frac{\text{مل قلوى} \times \text{عياريته} \times ٢٨,٢}{\text{وزن العينة}}$$

$$\text{٪ أحماض دهنية حرة كلوريك} = \frac{\text{مل قلوى} \times \text{عياريته} \times ٢٠}{\text{وزن العينة}}$$

$$\text{٪ أحماض دهنية حرة كبالميتيك} = \frac{\text{مل قلوى} \times \text{عياريته} \times ٢٥,٦}{\text{وزن العينة}}$$

هـ ـ العدد اليودى أو الرقم اليودى :

يكون اليود مركبات إضافية باتحاده مع الروابط الزوجية الموجودة فى الأحماض الدهنية غير المشبعة الداخلة فى تكوين الجليسريدات ، وعلى ذلك فإن كمية اليود المستهلكة تتناسب طرديا مع عدد الروابط الزوجية فى المادة الدهنية . والرقم اليودى مقياس لدرجة عدم تشبع الدهون ، أى مقياس لقدرتها على الأكسدة ، والعدد اليودى Iodine Value هو عدد جرامات اليود التى تتفاعل مع ١٠٠ جرام دهناً أو زيتاً (أى عدد جرامات اليود اللازمة لتشبع الروابط الزوجية) .

المحاليل :

١ ـ محلول ويج Wij اليودى ، ويحضر بإذابة ١٢,٦ جم يود فى حامض خليك ثلجى ، ويكمل إلى لتر بحمض الخليك . يقسم المحلول قسمين متساويين ويمرر كلور جاف فى أحداهما حتى يصبح لونه مائلاً للاحمرار ، وعند تنقيطه بثيوكبريتات صوديوم عيارى يستهلك الحجم منه ضعف الكمية من الثيوكبريتات التى سبق أن استهلكت لنفس الحجم قبل تمرير الكلور ، بعد ذلك يخلط القسمان على بعض ويرج جيداً ، ويكون المحلول محتوياً على هاليد اليود ، الذى يتفاعل مع الروابط الزوجية أسرع من اليود ، فالمحلول عبارة عن ثالث كلوريد اليود مذاباً فى حمض الخليك الثلجى .

٢ ـ محلول ثيوكبريتات صوديوم $Na_2S_2O_3$ ٠,١ عيارى معلوم القوة .

٣ ـ كلورفورم .

٤ ـ دليل ١ ٪ نشا (إذا كان النشا غير ذائب فيرشح قبل الاستعمال) .

الخطوات :

١ ـ زن بالضبط ٠,٢ ـ ٠,٥ جم زيتاً أو دهناً فى دورق مخروطى سعته ٢٥٠ مل محكم الغطاء الزجاجى .

٢ ـ أضف حوالى ٢٥ مل كلورفورم + ٢٥ مل بالضبط من محلول ويج اليودى ، وسد الدورق مباشرة ورجه جيداً ، ثم ضعه نصف ساعة فى مكان مظلم .

٣ ـ نقط محتويات الدورق بعد ذلك بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم المعلوم القوة ، وعندما يصل لون المحلول بالدورق إلى اللون الأصفر الفاتح أضف حوالى ١ مل دليل نشا ، ورج الدورق جيداً ، ثم استمر فى إضافة محلول الثيوكبريتات ، مع الرج حتى زوال اللون الأزرق .

٤ ـ اجر تجربة خالية Blank بدون إضافة الزيت ، لتقدير المكافئات الكلية لليود الذى أضيف للتفاعل مع الزيت .

الحساب :

العدد اليودى = (ح١ − ح٢) × ع × ١٢٦,٩ × ١٠٠ / ١٠٠٠ × وزن العينة .

حيث إن ح١ = حجم الثيوكبريتات مل اللازمة للتعادل فى التجربة الخالية .

ح٢ = حجم الثيوكبريتات مل اللازمة للتعادل فى التجربة الأصلية .

ع = عيارية الثيوكبريتات .

١٢٦,٩ = الوزن المكافئ لليود .

ملاحظات :

قد يستبدل الكلورفورم برابع كلوريد الكربون ، كما قد يستبدل محلول ويج بمحلول يود أحادى الكلور : [أ ـ بإذابة ١٣ جم يود فى خليط من ٣٠٠ مل رابع كلوريد كربون + ٧٠٠ مل حمض خليك ثلجى ثم إضافة محلول من ١٥ جم يوديد بوتاسيوم فى ١٠٠ مل ماء إلى ٢٠ مل من هذا الخليط السابق . أو ب ـ بإذابة ٨ جم أيودين ثلاثى الكلوريد + ٩ جم يود فى ٣٠٠ مل رابع كلوريد كربون ، وأكمل إلى لتر بحمض الخليك الثلجى، ويحفظ فى مكان مظلم منخفض الحرارة] ، ويحضر محلول ٠,١ عيارى ثيوكبريتات صوديوم بإذابة ٢٤,٨ جم من المادة النقية ١٠٠ مل ماء وأكمل إلى لتر ، ثم إذابة ٠,٣٥٦٨ جم يودات بوتاسيوم مجففة على ١١٠ ° م ويكمل الحجم إلى لتر (٠,٠١ عيارى) وتعاير الثيوسلفات باليودات فى وجود دليل نشا .

يجب إذابة العينة أولاً إن لم تكن سائلة ، وترشح إن كانت غير نقية لإزالة الشوائب والماء ، والعينة المأخوذة يجب أن تضمن وفرة اليود فى كمية محلول Wij ، لذلك يجب حسابها بالجرام (٢٦/رقم اليود المتوقع) .

محلول Wij حساس للحرارة والرطوبة والضوء فيخزن فى مكان بارد مظلم ولا يجب تعرضه لحرارة أعلى من ٣٠ ° م .

و ـ الأحماض العضوية :

لها أهمية فى مواد العلف لتأثيرها على طعم العلف وقيمته الغذائية ، ووجودها فى صورة حرة فى الدهون والزيوت دلالة على التحلل المائى للجليسريدات أو تزنخها ، والأحماض العضوية معظمها أحماض هيدروكسيلية ، تحتوى مجموعة أو أكثر من الكربوكسيل ، وهى عديمة الأزوت ، ويمكن استخلاصها بالإيثير من المحاليل المائية المحمضة ، أى يمكن أسترتها ، وبعضها متطاير ؛ لذا من المهم تقدير الحموضة سواء كلية أو ثابتة أو معايرة .

ز ـ الحموضة Acidity أو الحموضة المعاير Titratabel Acidity :

لتقدير حموضة مادة علف ، يؤخذ منها كمية كافية لتعطى تنقيط كاف ، وهذه العينة يتراوح وزنها مابين ١٠ إلى ٥٠ جم ، يضاف إليها ٥٠ مل ماء مقطراً (وإذا كانت العينة غير ذائبة فى الماء فيضاف إليها ٥٠ مل كحولاً متعادلاً) وتقلب . نقط بالصودا الكاوية ٠,١ عيارى فى وجود دليل الفينولفثالين حتى نقطة التعادل (فى العينات الملونة بشدة يجرى التعادل بقياس التغيير فى PH) ، وظهور اللون البنفسجى الثابت [يفضل التنقيط على الساخن ، أو مع التقليب ، والرج المستمر تحت تفريغ ، أو بالغليان وذلك

للتخلص من CO_2 لتجنب زوال لون الدليل عند انتهاء التعادل بتفاعل حمض الكربونيك مع أيونات الهيدروكسيل ، فيفقد الدليل القدرة على إظهار تغييرات اللون . مع عدم التسخين لمدة طويلة حتى لا يفقد جزءاً من الأحماض المتطايرة فيؤثر على النتيجة ، فيكفى التسخين أو الغليان ٣٠ ـ ٦٠ ثانية ، أو قد يضاف ماء مغلى متعادل للمستخلص] ، وفى حالة العينات الملونة بشدة يتم تخفيفها قبل التنقيط ، مع مراعاة عامل التخفيف عند حساب الحموضة . ويتم حساب الحموضة الكلية Total acidity كنسبة مئوية وزنية كالتالى:

٪ حموضة كلية = حجم القلوى المستخدم × عياريته × حجم العينة الكلى × الوزن المكافئ للحامض × ١٠٠ / الحجم من العينة المعاير × وزن العينة × ١٠٠٠ .

وعادة تقدر الحموضة فى مواد العلف فى صورة حمض أوليك الذى وزنه المكافئ ٢٨٢,٤٦ . وفيما يلى الأحماض العضوية وأوزانها المكافئة لكل ١ مل من القلوى ٠,١ عيارى (العامل) :

الحامض	وزنه الجزيئى	وزنه المكافئ	العامل
خليك	٦٠,٠٥	٦٠,٠٥	٠,٠٠٦٠
بيوتريك	٨٨,١٠	٨٨,١٠	٠,٠٠٨٨
لاكتيك	٩٠,٠٨	٩٠,٠٨	٠,٠٠٩٠
ماليك	١٣٤,٠٩	٦٧,٠٥	٠,٠٠٦٧
أوليك	٢٨٢,٤٦	٢٨٢,٤٦	٠,٠٢٨٢
إكساليك	٩٠,٠٤	٤٥,٠٢	٠,٠٠٤٥

وقد يقدر مايعرف بالحموضة الثابتة fixed acidity بتبخير وزن معلوم من العينة مع الماء، ثم معايرة الحموضة الكلية فى العينة ، ثم تقدر الحموضة الطيارة Volatile acidity ، وهى الفرق بين الحموضة الكلية والثابتة ، أو تقدر كحموضة فى ناتج تقطير العينة بالبخار، وذلك كأحماض طيارة فى صورة حمض أوليك ، أو غيره من الأحماض (بالضرب فيما يكافئه المليلتر من القلوى ٠,١ عيارى من هذا الحمض المعين) .

وتقدر الأحماض الدهنية الحرة فى الأعلاف الزيتية ، كزيت السمك والحبوب الزيتية والتى يجب ألا تتعدى ١ ٪ ، وإذا زادت عن ذلك دلت على تعفن أو تلف الزيت ، وانخفاض قيمته الغذائية ، سواء للزيت أو البذور الزيتية ، أو الأكساب . وتقدر الأحماض الدهنية الحرة بنفس الطريقة السابقة بالتنقيط بقلوى تركيز ٠,١ عيارى فى وجود دليل الفينولفثالين على العينة التى تم رجها بشدة مع الكحول ، ويعبر عنها فى صورة حمض

أوليك ، بتعيين حجم القلوى ٠,١ عيارى ، وضربه فيما يكافئه الملليلتر قلوى ٠,١ عيارى من حمض الأوليك (٠,٠٢٨٢جم) ، فيعبر عنها كنسبة مئوية من العينة ، أو قد تحسب فى صورة رقم حموضة ، أى عدد ملليلترات القلوى الأساسى اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الحرة فى ١٠٠ جم عينة ، أو قد تحسب فى صورة قيمة حموضة ، أى عدد ملليجرامات KOH اللازمة لمعادلة الأحماض الحرة فى ١ جم عينة . وتقدر الأحماض الدهنية الحرة فى منتجات الألبان المزنخة فى صورة حمض بيوتريك .

أما الأحماض الدهنية الكلية فتقدر فى العينة التى تم تصبنها بالبوتاسا الكاوية الكحولية، فيجرى تصبن ٥ جم عينة مع ٥٠ مل بوتاسا كحولية بالغليان أسفل مكثف هوائى لتمام التصبن (حوالى ٣٠ دقيقة) ، وتعاير الزيادة من القلوى بحمض HCL فوجود دليل فينولفثالين ؛ لتحديد عدد ملليلترات البوتاسا التى لزمت للتصبن (القلوى والحامض عياريتهما ٠,٥ عيارى) ومنها تقدر المللى لترات الأساسية ، ومن معامل التحويل للحامض تقدر الحموضة ، كأحماض دهنية كلية (أوليك أو بيوتريك مثلا) .

وتقدر النواتج الحامضية فى السيلاج وهى الأحماض الدهنية الطيارة (خليك ، بروبيونيك ، بيوتريك) علاوة على حمض اللاكتيك وذلك بطريقة ممايلى :

١ ـ باستخدام العمود Column :

فيؤخذ ٢ مل بالضبط من عصير السيلاج فى كأس سعة ١٠٠ مل + ٢ نقطة دليل أحمر فينول ثم ينقط بالصودا الكاوية ٠,١ عيارى تقريباً حتى التعادل ، ثم تجفف على حمام مائى ثم يضاف عليها ١ جم سليكا چيل ، ويقلب مع الطحن جيداً ، ثم يضاف ٣ـ٥ نقط حمض كبريتيك مركزا حتى يصير لون الدليل أصفر ، فيقلب للتجانس جيداً .

سد العمود من أسفل بورق ترشيح مقطع بكبسه بساق زجاجية ، ويعلم على العمود عند أحجام ٤ مل من أعلى الأنبوبة حتى أسفلها بعلامات واضحة (بين كل علامة والأخرى ٤ مل) . جهز فى كأس ١٠٠ مل ٦ جم سليكا چيل + ٤ مل حمض كبريتيك ٠,٥ عيارى ، ويقلب جيداً حتى تبدو السليكا جافة تماماً ، ثم يضاف عليها كمية من البنزين المشبع بالماء ، وتنقل كمياً بواسطة قمع زجاجى إلى العمود ، وتكبس بضغط الهواء حتى يطرد معظم البنزين إلا حوالى ٠,٥ مل منه فوق عمود السليكا ، ثم يضاف حوالى ٦ مل بنزيناً مشبعاً بالماء (الطبقة العليا) .

تنقل العينة المخلوطة بالسليكا (باستعمال قمع) كمياً إلى العمود باستعمال فرشاة من الشعر ، ويكمل النقل بالبنزين المشبع بالماء ، ويلف العمود بسرعة حول نفسه لطرد فقاقيع الهواء ثم يكبس الهواء لطرد البنزين إلا حوالى مل فوق سطح السليكا منعاً لجفافها . ثم يضاف حوالى ٤ مل بنزين / ١٪ بيوتانول (٩٩ مل بنزين + ١مل بيوتانول) ويكبس الهواء

مع استقبال القطرات النازلة فى دورق مخروطى به نقطتا دليل أحمر فينول (٠,٤ ٪ فى كحول) . يضاف ٣٠ مل بنزين / ١ ٪ بيوتانول ويكبس الهواء ، وتستقبل القطرات النازلة فى أنابيب اختبار بها دليل أحمر فينول بحيث تجمع ٤ مل من القطرات فى كل أنبوبة ، مع مراعاة عدم فقد أى نقطة خارج الأنابيب ، وأن تكون كلها متساوية الحجم (٤مل) ، وعند بقاء ١ مل من المذيب على السليكا يضاف ٣٠ مل بنزين / بيوتانول ٥ ٪ (٩٥ مل بنزين + ٥ مل بيوتانول) ، وتجمع النقط الساقطة **Fractions**، ثم ٥٠ مل من كل من بنزين / ١٠ ٪ بيوتانول ، فبنزين / ٢٠ ٪ بيوتانول ، فبنزين / ٣٠ ٪ بيوتانول على التوالى .

تنقط الأنابيب بصودا كاوية ٠,١ عيارى حتى التعادل ، وتدون كمية الصودا المستعملة لكل أنبوبة على حدة ، ويوقع رسم بيانى لتوضيح العلاقة بين المليمكافئات من الأحماض العضوية الموجودة فى الأنابيب وأرقام هذه الأنابيب . وعادة يظهر حمض البيوتريك ابتداءً من الأنبوبة ٥ حتى ١١ ، بروبيونيك من ١٢ ـ ١٦ ، الخليك من ١٧ ـ ٢٣ ، الفورميك من ٢٥ ـ ٣٣ ، سكسينيك ولاكتيك (متداخلان) ٣٤ ـ ٤٤ .

ويفضل عمل مقارنة مابين القيم المتحصل عليها بهذه الطريقة ومايتحصل عليها من تقدير الأحماض الدهنية الطيارة المقدرة بالتقطير البخارى .

٢ ـ بتقدير أحماض الخليك ، بيوتريك، لاكتيك بالتقطير :

يجرى كالتالى :

الأدوات :

دوارق سعة ١ لتر طويلة العنق ، دورق تقطير سعة ٥٠٠ مل ، دوارق معيارية سعة ١٠٠ ، ٥٠ مل ، مكثف عاكس ، وحدة تقطير (دورق بمكثف) .

المحاليل :

لبن جير (٢٠٠جم أكسيد كالسيوم / لتر ماء) ، كبريتات نحاس (٢٠٠جم / لتر ماء)، حمض كبريتيك (١ : ١) ، حمض كروميك (٤٥,٥ مل كبريتيك مركز + ٤٥,٥ جم أكسيد كروم / لتر ماء) ، صودا كاوية ٠,٠٥ عيارى .

عمل عصير السيلاج :

١٠٠ جم سيلاج تقطع صغيراً ، وتوضع فى دورق معيارى سعة لتر ، ويكمل للعلامة بالماء المقطر ، ويترك ١٢ ساعة على حرارة الغرفة . رج عدة مرات ثم رشح على ورق ترشيح. يكون التخفيف هنا ١ : ١٠ ، أما فى السيلاج الغنى بالسكر فيخفف ١٠ : ٢٠ على أن تضرب نسبة الحامض × ٢ .

إزالة التسكير :

يؤخذ ٢٠٠ مل من الراشح فى دورق معيارى ٢٥٠ مل + ٢٠ مل لبن الجير + ١٠

مل محلول كبريتات نحاس . بعد ساعة يكمل للعلامة بالماء المقطر ، ويرج ويرشح . يختبر تمام إزالة السكر ، بأخذ ٢ مل راشحاً فى أنبوبة اختبار مع نقط من الفا-نافثول ١٥ ٪ فى كحول مطلق (إيثانول) ، وتنصل طبقاتها بحمض كبريتيك مركز ، فتظهر حلقة بنفسجية غامقة عند حدود الطبقات : دلالة على عدم تمام إزالة السكر ، فتكرر العينة مع ٥٠ جم عينة بدلاً من ١٠٠ جم .

تقدير حمض الخليك وحمض البيوتريك :

يؤخذ ٢٠٠ مل من الراشح الرائق فى دورق مستدير طويل العنق سعة ٥٠٠ مل + ٥ مل H_2SO_4 مخفف (١ / ١) مع عدد كريات زجاج أو حجر خفاف ، ويرج لمدة قصيرة ثم يوصل بمكثف مع وضع دورق معيارى سعة ١٠٠ مل أسفل المكثف . فى خلال ٢٠ دقيقة (من بدء الغليان أدر منظم الموقد لينخفض اللهب) يجمع ١٠٠ مل فى الدورق المعيارى ، ثم يجمع ٥٠ مل أخرى فى دورق معيارى ثانى مباشرة دون وقف التقطير عند تغيير الدوارق . إذا حدث أثناء الغليان فوران فتعاد التجربة بوزن ٥٠ جم عينة (بدلاً من ١٠٠ جم) والتخلص من سكرها بمقدار ٢٠ مل لبن جير + ١٠ مل محلول كبريتات نحاس .

تقدير حمض اللاكتيك :

يؤخذ المتبقى فى دورق التقطير (٥٥مل) مع ٥٥ مل من محلول الكبريتيك والكروميك، ويغلى ٥ دقائق أسفل مكثف عاكس ؛ وذلك لأكسدة حمض اللاكتيك ، وأخيراً يضاف إلى محتويات الدورق ١٠٠ مل ماء مقطراً من خلال المكثف . ثم يوصل الدورق ثانية بمكثف والتقطير ، ويجمع ٥٠ مل متقطراً فى ظرف ١٠ دقائق فى دورق معيارى .

المعايرة :

تتم معايرة الدوارق المعيارية الثلاثة بواسطة NaOH ٠,٠٥ عيارى فى وجود دليل فينولفثالين حتى التعادل ، وتضرب القيم المتحصل عليها من المعايرة × ١,٢٥ (نتيجة التخفيف عند إزالة السكر) ، ويشار إليها بالحرف D1 , D2 , D3 .

حساب المحتوى من الحامض :

هناك ثوابت لتحويل هذه القيم للأحماض : خليك ، بيوتريك ، ولاكتيك ، وهى باستخدام هذا الجهاز للسيلاج كالتالى :

AA in D1 = 37.95 % , in D2 = 24.01 %

BA in D1 = 78.69 % , in D2 = 17.42 %

LA in D3 = 18.28 %

أى أن حـمض الخليك AA يوجد بنسـبة ٣٧,٩٥ ٪ فى الدورق المعيـارى الأول D_1 وبنسبة ٢٤,٠١ ٪ فى الدورق المعيارى الثانى D_2 ، بينما حمض البيوتريك BA يوجد فى نفس الدورقين بنسبة ٧٨,٦٩ ٪ ، ١٧,٤٢ ٪ على التوالى ، وحمض اللاكتيك LA يوجد بنسبة ٢٨ , ١٨ ٪ فى الدورق المعيارى الثالث D_3 .

ومن هذه الثوابت استنتجت المعادلات التالية لحساب النسبة المئوية لكل من الأحماض الثلاثة وهى :

$$AA\ \% = 0.0962\ D_2 - 0.0213\ D_1$$

$$BA\ \% = 0.0431\ D_1 - 0.0680\ D_2$$

$$LA\ \% = 0.1230\ D_3 - (0.0086\ AA + 0.0029\ BA)$$

أو حورت المعادلات كالتالى :

$$AA\ ml\ \ 0.05\ \ n = 6.41\ D_2 - 1.42\ D_1$$

$$BA\ ml\ \ 0.05\ \ n = 1.96\ D_1 - 3.09\ D_2$$

$$LA\ ml\ \ 0.05\ \ n = 5.47\ D_3 - (0.38\ AA + 0.13\ BA)$$

$$\%\ AA = AA \times 0.0150$$

$$\%\ BA = BA \times 0.0220$$

$$\%\ LA = LA \times 0.0225$$

ويقدر حمض اللاكتيك كذلك بطرق لونية ، إذ يؤدى كلوريد الحديديك (فى وسط حامضى) إلى وجود لون أصفر مع حمض اللاكتيك ، أو يستخدم الفينول كدليل لونى كذلك ، كما أن غليان حمض اللاكتيك مع الكبريتيك المركز يتحول إلى أسيتالدهيد ينتج لونا بنفسجياً مزرقاً عند تفاعله مع باراهيدروكسى ثنائى الفينيل ، وتقاس شدة الضوء على حوالى ٤٥٠ نانومتر . أو قد يقدر اللاكتيك بالتقطير بالبخار بوضع ٥٠ جم عينة فى دورق ٥٠٠ مل ذو فتحتين جانبيتين ، ثم أضف إليها ٢٠٠ مل ٢٠Nacl ٪ وأغلق الفتحة الأساسية (الوسطية) ، وعلّم على الدورق بعلامة تشير لحجم السائل ، ثم وصل إحدى الفتحتين الجانبيتين بتيار بخار ماء ، والفتحة الأخرى بمكثف على أن تكون أنبوبة البخار ممتدة لأسفل سطح السائل بدورق التقطير ، بإمرار البخار تتقطر العينة ويستقبل المتقطر فى دورق مخروطى (لاتترك السائل ينخفض عن العلامة بالدورق الأساسى للتقطير) ، ثم عاير المتقطر بالصودا الكاوية معلومة العيارية فى وجود الفينولفثالين واستنتج كمية حمض اللاكتيك (١مل ٠,١ مولر NaOH= ٠,٠٠٦٠٠٥ جم حمض لاكتيك) .

٣ ـ باستخدام الكروماتوجرافى الغازى :

تقدر الأحماض الدهنية الطيارة فى السيلاج كذلك باستخدام الكروماتوجرافى الغازى (بنفس طريقة تقديرها فى سائل الكرش) ، بأخذ عصير العينة المائى بعد ترشيحه للتحليل الكروماتوجرافى الغازى لتفريد الأحماض الدهنية الطيارة منفردة على عمود Paralith ٠,٢ ـ ٠,٣ م ، ومخلوط غازات (نيتروجين / هيدروجين / هواء بسرعة تدفق ٣ ، ٢ ، ٢٠ لتر / ساعة على الترتيب) وبرنامج حرارى ١٦٠° م للفرن ، ٢٤٠°م للحاقن ولمخرج الغازات .

٤ ـ تقييم كيماوى للسيلاج :

فقد وضع نظام يسمى Fliege system لتقييم مواد العلف المسيلجة عن طريق تقدير الأحماض الدهنية الطيارة المنفردة ، ثم ضربها فى معاملات لتحويلها لمكافئات حامضية ، وجمعها معاً ، ثم تنسب مكافئات كل حمض إلى مجموع المكافئات كنسبة مئوية من الحموضة الكلية ، واستخراج نقط Fliege المكافئة لهذه الحموضة ، وجمعها للحكم النهائى كالتالى : فى سيلاج ذرة ، قدرت الأحماض العضوية فوجدت :

النسبة المئوية للحامض	معامل التحويل للذرة	مكافئات حامضية	٪من الحموضة الكلية	نقط Fliege
حمض لاكتيك ٣,٦٦ ٪	١,١١٠٥×	= ٤,٠٦٤	٧٨,٠	٣٠
حمض خليك ٠,٦٢ ٪	١,٦٦٥٨×	= ١,٠٣٣	١٩,٨	١٨
حمض بيوتريك ٠,١٠ ٪	١,١٣٥٦×	= ٠,١١٤	٢,٢	٣٠
		٥,٢١١	١٠٠,٠	٧٨ (جيد)

وقد حسبت معاملات التحويل على أساس التركيز بالمول إذا وجد ١٠٠ جم من كل حمض دهنى فى لتر من ناتج السيلجة أى بقسمة ١٠٠جم على الوزن الجزيئى لكل حمض دهنى كالتالى :

حمض لاكتيك $CH3 -- CH -- COOH = 90(MW)$ ----- $100 : 90 = 1.1105$

حمض خليك $CH_3 - COOH = 60$ ----- $100 : 60 = 1.6658$

حمض بيوتريك $CH_3 -- CH_2 -- CH_2 -- COOH = 88$ ----- $100 : 88 = 1.1356$

ومن جدول خاص بذلك يقابل كل مدى معين من ٪ حموضة كلية لكل حامض تقدير معين (نقط Fliege) كالتالى :

نقط Fliege المقابلة للنسب المئوية للحموضة :

حمض لاكتيك		حمض خليك		حمض بيوتريك	
٪ حموضة كلية	نقط	٪ حموضة كلية	نقط	٪ حموضة كلية	نقط
صفر ـ ٢٥,٠	صفر	صفر ـ ١٥,٠	٢٠	صفر ـ ١,٥	٥٠
٢٥,١ ـ ٣٦,٠	١ ـ ٥	١٥,١ ـ ٢٥,٤	١٩ ـ ١٥	١,٦ ـ ٨,٠	٣٠ ـ ١٠
٣٦,١ ـ ٤٦,٠	٦ ـ ١٠	٢٥,٥ ـ ٣٢,٠	١٤ ـ ١٠	٨,١ ـ ١٧,٠	٩ ـ ٥
٤٦,١ ـ ٥٦,٠	١١ ـ ١٥	٣٢,١ ـ ٣٨,٧	٩ ـ ٥	١٧,١ ـ ٣٠,٠	٤ ـ صفر
٥٦,١ ـ ٦٦,٠	١٦ ـ ٢٠	٣٨,٨ ـ ٤٥	٤ ـ صفر	٣٠,١ ـ ٤٠,٠	-١ ـ -٥
٦٦,١ ـ ٧١,٢	٢١ ـ ٢٥	وأعلى		أعلى من ٤٠,٠	-١٠
٧١,٣ ـ أعلى من ٧٥	٢٦ ـ ٣٠				

ويكون التحكيم كالتالى :

١ ⟵ ٨١ ـ ١٠٠ نقطة ⟵ جيداً جداً

٢ ⟵ ٦١ ـ ٨٠ نقطة ⟵ جيداً

٣ ⟵ ٤١ ـ ٦٠ نقطة ⟵ مرضى

٤ ⟵ ٢١ ـ ٤٠ نقطة ⟵ معتدل أو مقبول

٥ ⟵ صفر ـ ٢٠ نقطة ⟵ سيئ

وعليه ـ فى مثالنا ـ نجد أن ٧٨ ٪ حموضة كلية فى صورة لاكتيك تعطى ٣٠ نقطة

وأن ١٩,٨ ٪ حموضة كلية فى صورة خليك تعطى ١٨ نقطة .

وأن ٢,٢ ٪ حموضة كلية فى صورة بيوتريك تعطى ٣٠ نقطة

وإجمالى النقط = ٧٨

أى أن تقدير جودة هذا السيلاج هو جيد .

ولتقدير الأحماض الدهنية يجرى لها تفريد على الكروماتوجرافى الورقى أو الغازى ضد محاليل قياسية من هذه الأحماض ، والأخير أكثر دقة وسرعة وحساسية ، وفيما يلى وصف لهذا التحليل :

تحضير العينة :

للتحليل الكروماتوجرافى يلزم استخلاص الدهن من العينة ثم أسترة هذا الدهن :

١ ـ استخلص الدهن بجهاز سوكسلت لمدة ساعة باستخدام مخلوط كلوروفورم / ميثانول (١/٢) أو أذب الدهن فى ٢٠٠ مل كلوروفورم .

٢ ـ أضف ١٢ مل ماء للمحلول ، وهز واتركه ٥ دقائق .

٣ ـ أضف ٢٠ مل كلورفورم ، وهز واتركه ٥ دقائق وكرر بإضافة ٢٥ مل ماء .

٤ ـ اطرد مركزيا لفصل الطبقات ، ثم اسحب طبقة الكلورفورم السفلى بسرنجة ، وبخرها تحت تفريغ أو نيتروجين .

٥ ـ خذ ٢٠٠ ـ ٥٠٠ مجم دهنا وأسترها مع هيدروكسيد البوتاسيوم أو الصوديوم الميثانولى ٠,٥ عيارى ، أسفل مكثف عاكس لمدة ٣ ـ ٥ دقائق .

٦ ـ أضف والمخلوط ساخن ١٥ مل مخلوطاً (٢جم كلوريد أمونيوم مذاباً فى ٦٠ مل ميثانول + ٣ مل حمض كبريتيك مركزاً ومغلياً أسفل مكثف عاكس ١٥ دقيقة) .

٧ ـ اخلط واغل أسفل مكثف عاكس ٣ دقائق ، برد وأضف الإيثير البترولى وهز .

٨ ـ افصل طبقة الإيثير ، وبخرها أسفل تفريغ أو نيتروجين ، ثم قدر الأحماض الدهنية بالكروماتوجرافى الغازى .

ظروف الكروماتوجرافى :

حجم العمود ١٧,٥٠ سم × ٣ م ، مملوء بواسطة ٢,٥ ٪ DEGS على ChromosorbG عالى الأداء (أو بواسطة بوليمر إيثيلين جليكول مع حمض الأديبيك على السيليت) ، حرارة الفرن ترتفع بمعدل ٤° م/دقيقة ، المدى الحرارى ١٣٠ ـ ٢١٥° م مع العمود الأول (أو ١٤٠ ـ ١٨٠° م مع العمود الثانى) ، الغاز الحامل نيتروجين ، معدل تدفق الغاز ٧٠ سم٣ / ق ، الكاشف بواسطة التأين فى اللهب .

وتقدر درجة الحموضة فى مواد العلف الغنية بالنشا برج ١٠ جم عينة مع ٥٠ مل كحول إيثانول ٦٧٪ على ٢٠° م فى كأس زجاجى ٢٠٠ مل ، ثم ترشيحها فى دورق مخروطى ١٠٠ مل ، وعند تجميع ٣٠ مل راشحاً يؤخذ منها ٢٥ مل بماصة فى دورق مخروطى آخر ١٠٠ مل مع ٣ نقط دليل فينولفثالين ، وينقط بالصودا الكاوية ٠,١ عيارى حتى التعادل ، فتكون درجة الحموضة للعينة = حجم الصودا الكاوية ٠,١ ع × ٢ .

فإذا كانت حتى ٣ درجات فلا يسمح بتخطى الفارق بين مكررتين التقدير عن ٠,٢ درجة حموضة ، أما فى حالة الوحدات الأعلى فلا يسمح بأن يتخطى هذا الفارق عن ٠,٣ وحدة درجة حموضة .

الأحماض الدهنية الحرة (ضوئياً) :

تقدر الأحماض الدهنية الحرة فى الزيوت بأخذ عينة (تحتوى ٢ ـ ١٤ ميكرومول أحماض دهنية حرة) فى أنبوبة ذات سدادة وتوضع فى حمام مائى على ٥٠° م لتطاير أى مذيبات ، وذلك فى ظروف من النيتروچين . أضف ٥ مل بنزين لإذابة العينة ، والتى قد

تتطلب تدفئة لتمام الذوبان . أضف ١ مل دليل (٥٪ محلول مائى من خلات النحاسيك يتم ترشيحه ، وضبط PH على ٦ ـ ٦,٢ باستخدام البيريدين) ورج لمدة دقيقتين ، اطرد مركزياً ٥ دقائق ، قدر الكثافة الضوئية فى الطبقة العليا على ٧١٥ نانومتر مقارنة بمحلول قياسى من حمض الأوليك .

حموضة اللبن :

تقدر حموضة اللبن بأخذ ١٠ مل بماصة فى بوتقتين ، الأولى مقارنة يضاف إليها ١ مل محلول روز أنيلين (أذب ٠,١٢ جم خلات روز أنيلين فى ٥٠ مل كحول (٩٥٪) تحتوى ٠,٥ مل حمض خليك ثلجى ، وأكمل إلى ١٠٠ مل بالكحول ، واحفظه فى ظلام ، خفف ١ مل منه إلى ٥٠٠ مل بالكحول والماء المقطر بنسب متساوية) وقلب . والى البوتقة الأخرى ، أضف ١ مل دليل فينولفثالين ونقط بهيدروكسيد الصوديوم (٠,١ عيارى) ، مع دوام التقليب حتى يظهر لون طوبى مماثل للون المقارنة . احسب الحموضة كحمض لاكتيك .

١ مل صودا كاوية ٠,١ عيارى = ٠,٠٠٩ جم حمض لاكتيك (درجات حموضة) .

الحموضة المعايرة للبول :

يضاف إلى ٢٥ مل بولاً ٥ جرام أوكسالات بوتاسيوم مطحونة ناعمة + ١ ـ ٢ نقطة من دليل فينولفثالين ١ ٪ ورج ١ ـ ٢ دقيقة فى دورق مخروطى ، ثم عاير فى الحال بمحلول هيدروكسيد صوديوم ٠,١ عيارى حتى يظهر لون قرنفلى فاتح . يعبر عن الحموضة بكمية مللى مكافئات الصودا الكاوية فى ٢٤ ساعة ، وهى تتوقف على العليقة ، فهى منخفضة فى آكلات الأعشاب (الحيوانات النباتية) ، ومرتفعة فى آكلات اللحوم . إلا أن الإصابة البكتيرية مثلاً تحلل يوريا البول فى القناة البولية ، فتزيد الأمونيا ، وتقلل حموضة البول ، وهو نفس ما يحدث لو ترك البول فى الهواء . وتزيد الحموضة فى حالة الاضطرابات المختلفة شاملة الحموضة وأمراض القلب والكلى . وتزيد الحموضة فى البول فى حالة زيادة استهلاك الحيوان للأحماض المعدنية والفوسفات وكلوريد الأمونيوم .

ومن المقاييس الأخرى فى تقدير الأحماض الدهنية الطيارة قيم كل من :

ريخرت ، بولنسك ، كيرشنر Reichert - Polenske - Kirschner Values وتقدر هذه القيم الثلاثة كالتالى :

تحضير العينة :

تسخن العينة حتى ينفصل الدهن ، مع عدم رفع الحرارة عن ٥٠° م . رشح الدهن خلال ورق ترشيح جاف .

التقدير :

١ ـ زن ٥ جم من عـينة الدهن إلى دورق بولنسك . واجـرِ تقـدير خـاوى Blank للكيماويات فى نفس الوقت مع العينات .

٢ ـ أضف ٢٠ جم جليسرول + ٢ مل ٥٠ ٪ (وزن / وزن) محلول هيدروكسيد صوديوم .

٣ ـ سخن مع الرج على لهب هادى حتى تمام التصبن وروقان السائل ، مع عدم ارتفاع الحرارة المؤدى للتلون . غط فوهة الدورق بغطاء زجاجى .

٤ ـ أضف ٩٣ مل ماء مقطراً يغلى (لطرد CO_2) . المحلول يجب أن يكون رائقا تماماً ولونه لا يتعدى الأصفر الشاحب .

٥ ـ أضف حجر خفاف + ٥٠ مل H_2SO_4 مخفف (٢٥ مل / لتر) . صل لجهاز التقطير المزود بمكثف ودورق لجمع المتقطر .

٦ ـ دفئ المخلوط حتى تذوب أى مادة غير ذائبة . يزداد اللهب ، وقطر ١١٠ مل من المحلول فى مدة ١٩ ـ ٢١ دقيقة .

٧ ـ أوقف التسخين ، وأزل دورق الغليان ودورق جمع المتقطر ، ضع كؤوساً لجمع أى نقط من كلا طرفى المكثف .

٨ ـ سد الدورق المدرج ، وضعه فى حمام مائى على ١٥ْم لمدة ١٠ دقائق .

٩ ـ اخلط ورشح خلال ورق ترشيح وات مان رقم ٤ .

١٠ ـ اغسل المكثف والوصلة الزجاجية والدورق المدرج ٣ مرات فى كل مرة ١٥ مل ماء مقطرا ، ورشحها على نفس ورقة الترشيح ناقلاً معها أى أجزاء غير ذائبة .

١١ـ أذب المادة غير الذائبة فى ١٥ مل إيثانول متعادل ٣ مرات . واجمع الراشح فى ذات الدورق المدرج ١١٠ مل .

قيمة ريخارت : (عدد الملليلترات القلوى ٠,١ عيارى اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الطيارة الذائبة فى الماء المقطرة من ٥ جم دهن) :

١٢ ـ خذ ١٠٠ مل من الراشح من خطوة رقم ٩ وضعها فى دورق مخروطى ٢٥٠ مل جافاً .

١٣ ـ نقط بهيدروكسيد الباريوم ٠,٠٥ مولر .

١٤ ـ ارمز للحجم المأخوذ فى المعايرة للعينة من القلوى بالرمز tr وللبلانك بالرمز tb .

فتكون قيمة ريخارت : $Reichert\ Value = 1.1\ (tr - tb)$.

قيمة بولنسك : (عدد الملليلترات القلوى ٠,١ عيارى اللازمة لمعادلة الأحماض

الدهنية الطيارة غير الذائبة فى الماء والمقطرة من ٥ جم دهن) :

١٥ ـ نقط المحلول من خطوة رقم ١١ بهيدروكسيد الباريوم ٠,٠٥ مولر مع استخدام الفينولفثالين كدليل .

١٦ ـ ارمز لحجم القلوى المستخدم فى معايرة العينة بالرمز tp وللبلانك بالرمز tc .

واحسب قيمة بولنسك : Polenske Value = (tp - tc) .

قيمة كيرشنر : (عدد الملليليترات القلوى ٠,١ عيارى اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية الطيارة الذائبة فى الماء والتى تكون أملاح فضة ذائبة فى الماء والمقطرة من ٥ جم دهن) .

١٧ ـ أضف ٠,٥ جم مسحوقاً ناعماً كبريتات فضة للمحلول ناتج خطوة رقم ١٣ .

١٨ ـ احفظه فى الظلام لمدة ساعة مع الرج من حين لآخر ثم رشح خلال ورق ترشيح وات مان رقم ٤ .

١٩ ـ ضع ١٠٠ مل راشحا فى دورق بولنسك جاف نظيف + ٣٥ مل ماء مقطراً بارداً (سبق غليانه لطرد CO_2) + ١٠ مل حمض كبريتيك مخففاً (٢٥ مل / لتر) + حجر خفاف . صل بجهاز التقطير السابق .

٢٠ ـ قطر ١١٠ مل فى خلال ١٩ ـ ٢١ دقيقة .

٢١ ـ كرر الخطوات ٧ ، ٩ ، ١٢ ، ١٣ .

٢٢ ـ ارمز للقلوى المستخدم فى معايرة العينة والبلانك بالرمزين td , tk على الترتيب واستنتج قيمة كيرشنر :

$$\text{Kirschner Value} = (tk - td)\frac{[100 + (tr - tb)]\,121}{10\,000}$$

ويلاحظ أنه يمكن استخدام الصودا الكاوية ٠,١ مولر بدلاً من هيدروكسيد الباريوم ٠,١ مولر إذا لم تقدر قيمة كيرشنر .

ح ـ المادة غير المتصبنة :

المادة غير القابلة للتصبن هى الجزء الذائب فى الدهون والزيوت وغير القابل للتصبن بالقلويات ، لكنه يذوب فى مذيبات الدهون ، ويحتوى على الكحولات الأليفاتية العالية ، ستيرولات ، صبغات ، هيدروكربونات .

وتحتوى زيوت الأسماك البحرية على نسبة عالية من المادة غير القابلة للتصبن عن الشحوم الحيوانية الأرضية ؛ لذا تقدر المادة غير القابلة للتصبن فى هذه الزيوت ، والزيوت النباتية ونواتج التقطير وغيرها .

وقد يقدر الجزء من العينة غير القابل للتصبن Unsaponifiable matter كالتالى :

١ ـ زن ٢,٥ جم عينة فى دورق .

٢ ـ صبن العينة بالغليان (أسفل مكثف عاكس) مع ٢٥ مل بوتاسا كاوية كحولية ٠,٥ مولر لمدة ساعة .

٣ ـ برد وانقل محتويات الدورق إلى قمع فصل باستخدام مالا يزيد عن ٥٠ مل ماء .

٤ ـ استخلص بالإيثير الإيثيلى ، وكرر الاستخلاص مرتين أخريين ، واجمع المذيب العضوى فى قمع فصل آخر .

٥ ـ اغسل طبقة الإيثير بثلاث كميات من هيدروكسيد البوتاسيوم المائية ٠,٥ مولر ، ثم مرتين بماء مقطر .

٦ ـ بخر حتى يتبقى حوالى ٥ مل ، انقلهم كمياً إلى دورق مخروطى ٥٠ مل (أو قابلة جهاز سوكسلت) جافاً وموزوناً ، وبخر على حمام مائى ثم أضف ٢ ـ ٣ مل أسيتون لإسراع التجفيف ، وأكمل التجفيف التام حتى ثبات الوزن تحت تفريغ على ٧٥ ـ ٨٠ °م. برد فى مجفف ثم زن الدورق .

٧ ـ أذب محتويات الدورق فى ١٠ مل كحول إيثايل متعادلاً (باستخدام الفينولفثالين حتى نقطة اللون القرنفلى الباهت) ، عاير بالصودا الكاوية ٠,٠٢ ع حتى اللون القرنفلى الباهت ، صحح وزن المتبقيات لمحتواها من الأحماض الدهنية الحرة (١مل من الصودا الكاوية ٠,٠٢ ع يكافىء ٠,٠٠٥٦ جم حمض أوليك) . صحح وزن المتبقيات كذلك بعمل بلانك لمحاليل التقدير بدون استخدام زيت أو دهن .

الحساب :

$$\text{المادة غير المتصبنة ٪} = \frac{\text{١٠٠ (وزن المتبقيات – وزن الحمض الدهنى – وزن البلانك)}}{\text{وزن العينة}} .$$

وهذه المواد غير القابلة للتصبن تشمل الستيرولات ، والكاروتينويدات وكحولات أحادية وخلافها .

ط ـ الزيوت الطيارة :

ولتقدير الزيوت الطيارة Volatile Oils يؤخذ ١٠٠ مل عينة سائلة ، أو ١٠ جم عينة صلبة فى دورق ٥٠٠ مل مسطح القاع . أضف ٢٠٠ ـ ٣٠٠ مل ماء مقطراً (للعينة السائلة ـ الصلبة على الترتيب) ، واخلط وأضف كريات زجاج ونقط سليكون مانع للفوران ، وبخر بالتدفئة مع الدوران ، ثم الغليان لمدة ساعتين فى جهاز تقطير خاص واجمع الزيت المتقطر وقدر حجمه .

$$\text{٪ زيوت طيارة} = \frac{\text{حجم الزيت المتقطر} \times \text{كثافته}}{\text{وزن العينة}} \times ١٠٠ .$$

ي ـ البيروكسيداز :

وللكشف عن إنزيم البيروكسيداز Peroxidase activity يحضر محلول ١ ٪ من

الجواياكول Guaiacol فى الماء ، وكذلك محلول فوق أكسيد هيدروجين (مخفف بخمس حجوم) ، واخلط حجمين متساويين منهما . حضر ٥٠ جم عينة وأضف إليها ٢٠ مل من مخلوط المحاليل السابقة ، وقلب جيداً . اسحب المادة المخلوطة إلى بوتقة بورسلان بيضاء ، ولاحظ تطور اللون الأحمر . إن لم يظهر لون أحمر فى خلال دقيقة واحدة فإنه لا يوجد نشاط لإنزيم البيروكسيداز .

رقم البيروكسيد Peroxide Value يقدر للكشف عن تلف الدهون كالتالى :

١ ـ زن ١ جم بالضبط من عينة مذابة مخلوطة جيداً فى أنبوبة اختبار قوية الجدران ٢٧× ٢ سم .

٢ ـ أضف ١ جم مسحوقاً ناعماً من يوديد بوتاسيوم + ٢٠ مل مخلوط ٢ : ١ من حمض خليك ثلجى : كلورفورم .

٣ ـ هز حتى ذوبان الدهن الكامل .

٤ ـ سد الأنبوبة بسدادة مطاط ينفذ منها أنبوبتا زجاج عليهما صنبورا زجاج .

٥ ـ مرر CO_2 فى هذا المحلول لمدة ١٠ دقائق .

٦ ـ افتح الصنابير، وضع أنبوبة الاختبار فى حمام ماء يغلى عند ملاحظة بدء تطاير بخار الكلورفورم من الأنبوبة سد الصنابير وبرد بسرعة .

٧ ـ نقط اليود المحرر بثيوسلفات الصوديوم ٠,٠٠٢ مولر باستخدام محلول طازج من ١ ٪ دليل نشا فى الماء .

٨ ـ اجر عينة خالية Blank على المحاليل ، واخصم قيمة التنقيط من العينات .

٩ ـ عبر عن النتيجة بالملليليترات ثيوكبريتات صوديوم ٠,٠٠٢ مولر اللازمة لكل ١ جم عينة أو عددجزيئات البيروكسيد / كجم دهن = $\frac{\text{٠,٥ × مل ثيوكبريتات × قوتها}}{\text{جم العينة}}$.

كما يقدر رقم البيروكسيد كذلك ضوئياً بطريقة حساسة جداً تعتمد على أكسدة الحديدوز إلى حديديك ، وقياس اللون الأحمر الناتج من الشيوسيانات . يوزن ٠,٣ جم زيتاً أو دهناً فى أنبوبة سعة ١٥ مل مع ٩,٦ مل كلورفورم / ميثانول (٧٠ / ٣٠) ، واخلط لإذابة العينة . أضف ٠,٦ مل كلورفورم / ميثانول (٧٠ / ٣٠) ، واخلط ثانية ، ثم أضف ٠,٠٥ مل محلول أمونيوم ثيوسيانات (٣٠ ٪) واخلط وقدر الكثافة الضوئية على ٥٠٠ نانومتر (Eo) ضد مقارنة من مخلوط الكلورفورم / ميثانول . أضف ٠,٠٥ مل كلوريد حديدوز (٠,٣٥ ٪ تحتوى ٢ ٪ حمض هيدروكلوريك ١٠ عيارى) ، واخلط وبعد ٥ دقائق تماماً قدر الكثافة الضوئية مرة أخرى (E_2) . اجر بنفس الطريقة تجربة خاوية من العينة(E_1) ، وكذلك تقدير للمحلول القياسى (١٠ مجم حديد / لتر (من كلوريد الحديديك) مع

الكلوروفورم / ميثانول وثيوسانات الأمونيوم وحمض الهيدروكلوريك ، واستخرج قيمة m أى ميكروجرامات الحديد $[m \equiv E2 - (Eo + E1)]$.

ومنها يقدر رقم البيروكسيد = $\frac{m}{\text{وزن العينة } \times 55{,}84}$ مللى مكافىء / كجم

ك ـ الفينولات :

١ ـ انقل ٥٠ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٥ ٪ مع ١٠ مل زيت (عينة) إلى دورق سعة ١٥٠ مل ذى ساق مدرجة بدقة ٠,١ مل .

٢ ـ رج على فترات لمدة نصف ساعة ، ثم أضف مزيداً من البوتاسا الكاوية حتى يرتفع الزيت إلى الساق المدرجة . اترك ٢٤ ساعة .

٣ ـ اقرأ حجم الزيت غير الممتص ، واحسب النسبة المئوية للزيت غير الممتص (الفينول) . ولاحظ أن إضافة ٢ مل من الزيلين يساعد فى فصل الزيت (على أن تخصم من حجم الزيت غير الممتص) .

ل ـ اختبار كريزكر :

وللتزنخ يجرى اختبار (كريزكر) Kreis Kerr test بوزن ١ جم عينة ذائبة ، ويضاف إليها كمية متساوية HCl المركز + ١ مل ١ ٪ من فلوروجلوسينول phloroglucin فى الإيثير . التطور البطىء للون الأحمر يشير لاحتمال تزنخ العينة . وقد يعطى زيت القطن الخام تفاعلاً موجباً رغم عدم تزنخه . وللحكم الصحيح يجب أن يكون اللون الناتج عن التزنخ وردياً أو أحمر (وليس وردياً فاتحاً) . وقد نحتاج إلى تخفيف العينة بالإيثير البترولى ، فإذا ظهر اللون رغم التخفيف دل على تمام التزنخ .

ومن دراسة صفات الدهون يتضح أن رقم التصبن يتناسب عكسيا مع متوسط الأوزان الجزيئية للأحماض الدهنية الموجودة ، فكلما زادت كمية الأحماض الدهنية ذات الوزن الجزيئى المنخفض (فى وزن معين من الدهن أو الزيت) فإنها تتطلب كمية قلوى لتصبينها أكبر من اللازمة لتصبن الأحماض الدهنية ذات الوزن التجزيئى العالى(الموجودة فى نفس الوزن من دهن أو زيت آخر) .

ومن العدد اليودى للزيت يمكن تقسيم الزيوت إلى جافة ونصف جافة وغير قابلة للجفاف ، والأولى لها عدد يودى أعلى من ١٣٠ ، والثانية مابين ١٠٠ ـ ١٣٠ ، والأخيرة أقل من ١٠٠ . وفيما يلى بعض الخصائص لبعض الزيوت والدهون :

الزيت أو الدهن	رقم التصبن (مجم / جم)	العدد اليودى (جم/١٠٠جم)	المادة غير المتصبنة (جم / كجم)	رقم الحموضة (مجم / كجم)	رقم البيروكسيد (مجم /)كجم
زيت جوز هند	٢٥٣	٩			
زيت نخيل	٢٠٠	٥٥			
دهن بقر	١٩٥	—			
زيت بذر قطن	١٩٣	١١٠	١٥	٠,٦	—
دهن غنم	١٩٣	—			
زيت فول صويا	١٩٢	١٢٨	١٥	٠,٦	١٠
زيت سمسم	١٩١	١٠٨	٢٠	٤	١٠
زيت ذرة	١٩١	١٢٠	٢٨	٤	١٠
زيت خردل	١٧٣	١٠٤			
زيت عباد شمس	—	١٢٧	١٥	٤	١٠
زيت فول سودانى	١٩١	٩٣	١٠		
زيت كاكاو	—	٣٥			

ونانج أكسدة الزيوت والدهون هى الهيدروبيروكسيدات ، والبيروكسيدات ونواتج تحللها من الدهيدات وكيتونات وأحماض . وقد تتفاعل الهيدروبيروكسيدات مع الروابط المزدوجة لإحداث أكسدة كيماوية ينتج عنها فقد سريع للروابط غير المشبعة ونقص فى البيروكسيدات للأكسدة الذاتية الحادثة .

م ـ رقم الأسيتيل :

ولتعيين رقم الأسيتيل Acetyl Value (وهو عدد ملليجرامات البوتاسا الكاوية اللازمة لمعادلة حمض الخليك المتولد من تحليل ١ جم دهن مؤستل) ويجرى التقدير كالتالى :

١ ـ يؤخذ ١٠ جم دهناً ، ويغلى مع ٢٠ مل أنهيدريد الخليك فى دورق مستدير القاع تحت مكثف عاكس لمدة ساعتين .

٢ ـ تنقل المحتويات إلى كأس به ٥٠٠ مل ماء ساخناً ، ثم يغلى لمدة نصف ساعة ، ويبرد .

٣ ـ بعد انفصال الطبقتين ، تسحب الطبقة المائية ، ثم يغسل الزيت المتبقى ٣ مرات بالماء لإزالة أى أثر للحامض . اجمع الدهن على ورق ترشيح ويجفف على ١٠٠ م .

٤ ـ خذ ١ جم بالضبط من الدهن المؤستل فى دورق مخروطى نظيف جاف + ٥٠ مل بوتاسا كاوية كحولية ٠,١ عيارى (معلومة العيارية بالضبط بتنقيط حجم معلوم مع وجود الفينولفثالين بواسطة HCl ٠,١ عيارى)ويسخن على حمام مائى نصف ساعة ، أو حتى

تمام التصبن أى بذوبان كل الدهن أو الزيت .

٥ ـ انقل المحلول إلى طبق تجفيف ، وبخر الكحول ، وخذ المتبقى فى ١٠ ـ ١٥ مل ماء .

٦ ـ يضاف HCl ٠,١ عيارى يعادل بالضبط KOH المضافة للتصبن ، وسخن إلى ٧٠ ـ ٨٠° م واسحب الطبقة المائية بتمريرها فى ورقة ترشيح مبتلة .

٧ ـ المتبقى يغسل ٣ مرات بالماء الساخن ، وتضاف كميات الماء هذه إلى الطبقة المائية سابقة الفصل .

٨ ـ نقط الطبقة المائية وما أضيف لها من ماء الغسيل بالصودا الكاوية ٠,١ عيارى ، ومقدار الصودا الكاوية يجب أن يساوى حمض الخليك المنفرد نتيجة التحليل المائى (التصبن) .

عبر عن رقم الأسيتيل بملليجرامات البوتاسا الكاوية / جم دهن مؤستل .

ن ـ الفترة التمهيدية :

تقدير الفترة التمهيدية بواسطة أزرق الميثيلين Methylene blue induction period ،وهى المدة التى تمر على الزيت أو الدهن قبل أن يبدأ فى امتصاص الأوكسجين رغم تعرضه له . والفترة التمهيدية مقياساً للمواد المضادة للأكسدة فى الزيوت والدهون ، فكلما زادت نقاوة الزيت أو الدهن قصرت الفترة التمهيدية ، ويجرى التقدير كالتالى :

١ ـ ينقل ٥ مل زيتا إلى كل من أنبوبتى اختبار .

٢ ـ أضف للأنبوبة الأولى ١ مل محلول أزرق ميثيلين (٠,٠٢٥٪ لا مائى خالى الإيثانول) .

٣ ـ يضاف للأنبوبة الثانية ٠,٧٥ مل محلول أزرق ميثيلين وتغطى الأنبوبتان لمنع الضوء عنهما (حافز للأكسدة) .

٤ ـ ترج الأنبوبتان وتوضعان فى حمام مائى على ٧٠° م لمدة دقيقتين وتراقب .

٥ ـ باستخدام ساعة إيقاف ليحدد الوقت اللازم ليصل لون أزرق الميثيلين فى الأنبوبتين إلى مستوى واحد . هذا الوقت بالدقائق هو الفترة التمهيدية ، وهى تتراوح مابين ٤ ـ ٢٩ دقيقة فى الزيت الخام .

١٠ ـ دلائل الجودة المرتبطة بالدهن فى الأسماك :

الأسماك الغنية بالدهن تفقد جودتها بالتخزين خلال عملية التدهور الأكسيدى للمركبات الدهنية ، وتتوقف معدلات الأكسدة على طبيعة الأحماض الدهنية ، فكلما زاد عدم تشبعها زادت أكسدتها . والأكسدة عملية ينتج عنها أصول حرة فى شكل الدهيدات وأحماض وأبوكسيدات وجليسريدات ثنائية وأحادية ونواتج بلمرة . إلا أن نواتج الأكسدة

مستمرة فى تحولها بدخولها فى تفاعلات أخرى ؛ لذلك فقياس درجة الأكسدة شيء صعب . وأهم ثلاث طرق لقياس الأكسدة فى المنتجات السمكية هى اختبار حمض ٢ ـ ثيوباربيتوريك ، قيمة البيروكسيد ، قيمة الكاربونيل ، إلا أنها تزيد إلى أقصى قيمتها ثم تنخفض ؛ لذلك يقدر عادة اختباران للحكم على الأكسدة ، خاصة عند ارتفاع محتوى الأحماض الدهنية الحرة ، وفى النهاية يجرى اختبار حسى بالطبخ للحكم على جودة المنتج.

ورغم شهرة اختبار حمض ٢ ـ ثيوباربيتوريك إلا أنه مازال ينتقض لعدم تخصصه ، ولطبيعة المالونالدهيد المؤقتة ، ولعدم واقعية محتوى المالونالدهيد كدليل أكسدة بوجه عام ، لأن كمية المركب المتكونة تتوقف على نوع الأحماض الدهنية عديمة التشبع الموجودة فى النسيج ، إذ إن المالونالدهيد يتكون فقط من البيروكسيدات المنشقة من الأحماض الدهنية المحتوية ٣ روابط مزدوجة أو أكثر ، كما يوجد عديد من المواد التى تتداخل مع هذا الاختبار.

والبيروكسيدات منتجات أولية للأكسدة ، إلا أنها قصيرة الحياة ، والاستفادة منها كدليل أكسدة محدود ومقصور على المراحل الأولى لتطور التزنخ ، إذ تتكسر البيروكسيدات إلى الدهيدات أو ترتبط بالبروتينات . فيستخدم اختبار قيمة البيروكسيد لقياس المراحل الأولى والمتوسطة لأكسدة الدهون والزيوت المستخلصة من المنتجات البحرية . وأشهر الطرق استخداماً هى طريقة يوديد البوتاسيوم والثيوكبريتات ، مع حماية المستخلص الدهنى من الأوكسجين والضوء والحرارة لحين التقدير ؛ لذا يحفظ بالتجميد .

أ ـ أما قيمة الكاربونيل : فهى مقياس لمنتجات نهائية أكثر ثباتاً من البيروكسيدات التى تتحول إلى منتجات ثانوية تحتوى الكربونيل (C=O) ، وهذه الأخيرة قد تكون أحجار بناء لمركبات طيارة ذات رائحة . وأشهر طرق التقدير هى طريقة الهيدرازون ، لكن لا يمكن الاعتماد على هذا الاختبار بمفرده فلازم تقدير آخر مع تقدير قيمة الكربونيل للحكم على أكسدة الدهن فى السمك المجمد ، أو من منتجات الأسماك المختلفة .

ويجرى التقدير فى عينة الدهن بعد تحطيم محتواها من البيروكسيدات ، باستخدام دلائل ومحاليل خالية الكربونيل كالآتى :

١ ـ يهدم البيروكسيد بإضافة ١٠ مل محلول كلوريد قصديروز ٠,٥ ٪ (٠,٥جم فى ٥٠ مل ميثانول + ٥٠ مل بنزين) إلى الدهن ، ويحفظ على درجة حرارة الغرفة لساعتين مع الهز من حين لآخر . أضف ٤٠ مل محلول كلوريد بوتاسيوم ٢٠ ٪ (١٠٠ جم كلوريد بوتاسيوم تذاب فى ٤٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ١,٢ عيارى ويكمل بالحمض إلى ٥٠٠ مل) وقلب ، وانقل إلى قمع فصل ، وتغسل الآنية بكلوريد البوتاسيوم ٥ مل ثم ٢٥ مل بنزيناً ، وتضاف إلى قمع الفصل ، اخلط واترك لفصل الطبقات . انقل مايمكن نقله

من طبقة البنزين العليا إلى كأس ، أضف ٢٥ مل بنزينا إلى القمع وأعد الرج والفصل واجمع البنزين . أعد طبقات البنزين إلى قمع الفصل بعد سحب الطبقة السفلى (كلوريد بوتاسيوم) ، أضف ٢٥ مل كلوريد بوتاسيوم مائى ٣٠٪ ورج واترك لفصل الطبقات ، اسحب الطبقة السفلى ، كرر الغسيل ٣ مرات ، رشح ببطء البنزين إلى دورق معيارى ١٠٠ مل خلال كبريتات صوديوم لا مائية ، اغسل قمع الفصل بالبنزين واستمر فى غسيل كبريتات الصوديوم حتى تدريج الدورق المعيارى .

٢ ـ يتم تركيز الدهن فى المستخلص ، بوضع ١٠ مل من المستخلص البنزينى فى طبق تقدير رطوبة ألمونيومى (٣ مكررات) ، اسمح للبنزين بالتبخير فى خزانة غازات خالية من التراب حتى يتبقى الدهن (حوالى ١ ـ ١,٥ ساعة) . انقل الأطباق إلى فرن تجفيف على ١١٠ ْم لمدة ساعة ، وبرد على حرارة الغرفة (١٥ دقيقة) وزن . واحسب محتوى الدهن بالجرام / مل بنزين = وزن المتبقى / حجم المستخلص .

٣ ـ عاير الاسبكتروفوتومتر على ٤٤٠ نانومتر ، بضبط الجهاز على امتصاص صفر للبوتاسا الكاوية ٠,٠٥ مولر ، ثم قدر امتصاص بيكرومات البوتاسيوم (٠,٢٨جم هيدروكسيد بوتاسيوم تذاب فى ٨٠ مل ماء مقطراً + ٠,٠٣٠٣ بيكرومات بوتاسيوم ويكمل إلى ١٠٠ مل) ويقدر معامل تصحيح الامتصاص (F) = ٠,٥٠٢ / امتصاص البيكرومات .

٤ ـ يقدر الكاربونيل بسحب ٣ مل محلول حمض ثلاثى كلوروخليك ٤,٣ ٪ (٤٣جم فى ١٠٠٠ مل بنزين خالى الكاربونيل) + ٥ مل محلول ٢ ـ ٤ دى نيتروفينيل هيدرازين (٠,٥ جم فى لتر بنزين خالى الكاربونيل هذا المحلول ثابت لعدة شهور) + ٥ مل مستخلص بنزين (يحتوى الدهن) ، أو ٥ مل بنزيناً نقياً للبلانك . سد الأوانى واخلطها وسخن فى حمام مائى نصف ساعة على ٦٥ ْم . برد على حرارة الغرفة بماء جار ، هذا المحلول ثابت عدة ساعات . أضف إلى كل آنية ١٠ مل محلول ٥ ٪ هيدروكسيد بوتاسيوم، وحضن على حرارة الغرفة ١٠ دقائق بالضبط ثم خفف إلى ٥٠ مل بالإيثانول خالى الكاربونيل (٢ لتر إيثانول ٩٥ ٪ مع ١ جم NaBH4 تحت مكثف عاكس ٢,٥ ساعة ثم قطر مع إهمال أول ٥٠ مل وآخر ١٠٠ مل واحفظ فى زجاجة غامقة من الضوء) . حضن على حرارة الغرفة ١٠ دقائق ثم قدر الكثافة الضوئية .

٥ ـ احسب قيمة الكاربونيل الكلية كوحدات امتصاص / جم دهن =

$$\frac{\text{الامتصاص} \times \text{معامل التصحيح}}{\text{جم دهن/مل} \times \text{حجم البنزين فى الآنية (٥مل)}}$$

ملاحظات :

البنزين خالى الكاربونيل : إذا كانت الكثافة الضوئية للبنزين مقابل الماء على ٤٣٠ نانومتر أقل من ٠,٣٥ يكون البنزين مقبولاً ، وإلا يتم تنقيته بإضافة ٥ جم ٢ ـ ٤ ـ دى نيتروفينيل هيدرازين + ١ جم حمض ثلاثى كلوروخليك إلى لتر بنزين تحت مكثف عاكس لمدة ساعة ثم قطره مع إهمال أول ٥٠ مل وآخر ١٠٠ مل واحفظه فى آنية ملونة بعيداً عن الضوء .

الميثانول خالى الكاربونيل : يضاف ٥ ـ ١٠ جم حبيبات ألمونيوم إلى لتر ميثانول + ٨ – ١٠ جم هيدروكسيد بوتاسيوم تحت مكثف عاكس لمدة ساعة ثم قطر واهمل أول ٥٠ مل وآخر ١٠٠ مل واحفظه من الضوء فى آنية ملونة .

ب ـ الأحماض الدهنية الحرة : يختلف إنتاجها طبقاً لدرجة حرارة التخزين ، نوع العضلات ، نوع السمك ، محتوى الدهن ، الموسم . وتستخدم كدليل على جودة السمك والمنتجات الغذائية . وتنتج الأحماض الدهنية الحرة بتحلل الجليسريدات الثلاثية والفوسفوليبيدات ، وتقدر فى الدهون والزيوت والأسماك ومنتجاتها غير المعاملة بالحامض ، وذلك بمعايرة مجاميع حمض الكاربوكسيلك بالصودا الكاوية فى وجود دليل أرجوانى ميتاكريزول ، ويعبر عنها بالميكرومول / جم زيت أو نسيج ، أو كنسبة مئوية وزنية من الزيت (بالتعبير عنها كحمض أوليك) .

١ ـ ويقدر فى المواد الصلبة (لحم أو مسحوق) بأخذ ١٠جم عينة + ٥٠ مل كلوروفورم T + ٥٠ مل ميثانول ويخلط فى خلاط دقيقة . رشح ، أضف ٤٥ مل ماء مقطراً إلى الراشح ، انقل إلى قمع فصل ورج واترك ٢ ـ ٣ ساعات رشح الطبقة السفلى (كلوروفورم) على كبريتات صوديوم لا مائية إلى دورق معيارى ١٠٠ مل وأكمل بالكلوروفورم . اسحب منه ١٠ مل إلى طبق ألمونيوم واتركه يتبخر فى خزانة غازات ، ثم ضع الطبق يجف ساعة على ١٠٣ م ، برد وزن . انقل باقى المحلول من الدورق المعيارى إلى دورق مخروطى مع ٧٠ مل ٢ ـ بروبانول + ٣٥ مل ميثانول + ٨ نقط دليل أرجوانى ميتاكريزول ، عاير حتى نهاية نقطة التعادل البنفسجية بالصودا الكاوية ٠,٠٥ عيارى . مع عمل بلانك من نفس المحاليل .

٢ ـ وللتقدير فى عينات الزيوت أو الدهون ، يوزن ١ جم عينة مع ٧٥ مل كلوروفورم / كحول إيزوبروبيل / ميثانول (٢ / ٢ / ١) لإذابة الدهن . أضف ٤ ـ ٥ نقط دليل ، عاير بالصودا الكاوية ، أجر بلانك .

٣ ـ احسب نسبة الدهن من الطريقة الأولى =

$$\frac{(\text{وزن الطبق بالدهن جاف} - \text{وزن الطبق}) \times \text{حجم الدورق المعيارى}}{\text{الحجم المسحوب لوضعه فى الطبق} \times \text{وزن العينة الأصلى}} \times ١٠٠$$

ثم احسب محتوى الأحماض الدهنية الحرة :

$$FFAT = \frac{1000 \times N_1 \times (V_4 - V_5)}{W_2 - \frac{V_2 \times W_2 \times P}{V_3}}$$

$$FFAF = \frac{FFAT}{F} \times 100$$

$$FFA = \frac{FFAT \times 2.82}{F}$$

حيث :

FFA = الأحماض الدهنية الحرة فى الدهن كنسبة مئوية كحمض أوليك .

$FFAF$ = الأحماض الدهنية الحرة فى الدهن كميكرومول / جم دهن .

$FFAT$ = الأحماض الدهنية الحرة فى النسيج كميكرومول /جم نسيج .

P = عدد محاليل راشح الكلوروفورم المسحوبة من الدورق المعيارى .

V_4 = حجم الصودا (مل) المعايرة للعينة .

V_5 = حجم الصودا (مل) المعايرة للبلانك .

F = ٪ دهن ، وزن العينة .

V_1 = حجم الصودا (٠,٠٥ عيارى) المعاير لوزن ٠,٣جم فثالات بوتاسيوم فى وجود الفينولفثالين (لمعايرة الصودا) .

V_2 = حجم المستخلص المسحوب للطبق .

V_3 = حجم الدورق المعيارى .

N_1 = عيارية الصودا .

٤ ـ احسب الأحماض الدهنية الحرة من الطريقة الثانية كميكرومول / جم دهن =

$$FFAF = \frac{1000 \times N_1 \times (V_4 - V_5)}{W_3 \times F}$$

أو كنسبة مئوية (حمض أوليك) من الدهن =

$$FFA = \frac{N_1 \times (V_4 - V_5) \times 28.2}{W_3}$$

حيث W_3= وزن الدهن (جم) .

١١ ـ مكونات دهنية مرتبطة بالتمثيل الغذائى :

أ ـ الأحماض الدهنية الطيارة في الدم وسائل الكرش :

الـــدم :

يضاف إلى ٢٠ مل من الدم ٨٠ مل حمض كبريتيك ٠,٢ عيارى ، وبعد ١٠ دقائق يضاف ٢٠ مل تنجستات صوديوم ١٠ ٪ . رشح ثم أضف ١ مل صودا كاوية ٣ عيارى إلى ٥٠ مل من الراشح خالي البروتين . حمض الأملاح بإضافة ٢ مل حمض كبريتيك ١,٦ عيارى (أو بإضافة إيثير أو ميثانول محمضين وهما الأفضل) .

سائل الكرش :

يؤخذ ٥ مل سائل كرش + ١٠ مل حمض ميتافوسفوريك ٢٥٪ واترك ٣٠ دقيقة ، واطرد مركزياً ١٠ دقائق بسرعة ٣ آلاف لفة / دقيقة .

وللتقدير : يؤخذ رائق العينات دون أى إجراءات أخرى للتحليل الكروماتوجرافى الغازى تحت ظروف برنامج حرارى من ٢٥٠° م للحقن لسرعة تبخيز العينة ، والعمود ملىء بمادة Tween 80 (٢٠ ٪) ، وحمض فوسفوريك ٨٥ ٪ (٢ ٪) على كروموسورب ، والعمود بطول ١ م وقطر ٦ مم ، وهو من الصلب الذى لا يصدأ ، وحرارة العمود ١٢٠° م ، ومخلوط الغازات من النيتروجين (١٢٠مل / دقيقة) والهيدروجين (٣٥ مل / دقيقة) والهواء (٢٥٠ مل/ دقيقة) . فتحت هذه الظروف يمكن خروج منحنيات الأحماض الدهنية الحرة ونظائرها فى ١٨ دقيقة . تقارن منحنيات محاليل قياسية لهذه الأحماض بمنحنيات العينات لتقدير تركيزاتها فى العينات .

ب ـ الأحماض الدهنية الطيارة الكلية فى الدم :

المحاليل :

١ ـ محلول حامض هيدروكلوريك ٠,١ عيارى (١٠مل حامضاً مركزاً فى اللتر) .

٢ ـ حامض أرثوفوسوريك مركزاً .

٣ ـ دليل أحمر الفينول (٠,٠٤ ٪) .

٤ ـ محلول صودا كاوية ٠,٠١ عيارى (٠,٤٢ جم فى اللتر أو 1 مل من ص أ يد ١٠٪ على لتر) ، ثم تقدر قوتها بالضبط لرابع رقم عشرى بواسطة حامض يد٢ كب أ٤ ٠,٠١ عيارى معلوم القوة) .

طريقة العمل :

١ ـ ترسيب البروتين من العينة : يؤخذ بالماصة ١٠ مل من العينة فى الدورق المعيارى ويضاف عليها ١٠ مل من حامض يدكل ٠,١ عيارى ، ثم يرج جيداً وبعد ٥ دقائق يكمل للعلامة بالماء المقطر ، ثم يفصل راسب البروتين بالترشيح ويؤخذ الراشح فى الدورق

المخروطي لتقدّر فيه الأحماض الدهنية الطيارة .

٢ ـ التقطير : يشغل الجهاز Markharm لمدة ٢٠ دقيقة على ماء مقطر لغسله ، ثم يوضع في الجهاز ٥ مل من العينة ثم يضاف ١ مل من حامض الفوسفوريك وتقفل فتحة العينة بالسدادة ، ويوضع فوقها كمية من الماء المقطر ، ويمرر البخار ، وتقفل فتحة البالوعة وتستقبل القطرات في القابلة حتى تجمع منها ٥٠ مل .

٣ ـ التنقيط : يوضع في القابلة نقطتان من دليل أحمر الفينول ثم يغمس داخل القابلة أنبوبة تمرير الهواء الخالي من ك أ٢ أو غاز النيتروجين ، ثم يجرى التنقيط بالصودا الكاوية ٠,٠١ عيارى حتى اللون البرتقالي ، وعدد ملليلترات الصودا ×قوتها = مللي مكافئ أحماض دهنية طيارة .

جـ ـ كوليسترول الدم :

خذ ٠,٥ مل سيرم أو بلازما مع ٥ مل محلول هيدروكسيد بوتاسيوم كحولي محضرة طازجاً (٦مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٣٣ ٪ + ٩٤ مل كحولاً مطلقاً) ، ورج جيداً ثم حضن على ٣٧ م لمدة ٥٥ دقيقة ، برّد إلى حرارة الغرفة ، ثم أضف ١٠ مل إيثير بترولي واخلط ، أضف ٥ مل ماء ورج دقيقة ، أطرد مركزياً ٥ دقائق . خذ ٤ مل رائق إيثير بترولي في أنبوبة جافة ، وحضنها على ٦٠ْم في حمام مائي ، بخر المذيب في الهواء .

حضر محلول قياسي (أذب ١٠٠ مجم كوليسترول جافاً في كحول مطلق ، وأكمل إلي ٢٥٠ مل فيكون التركيز ٠,٤ مجم / مل) بأخذ ٥ مل منه مع ٠,٣ مل محلول هيدروكسيد بوتاسيوم ٣٣٪ ، وأكمل كما سبق مع العينة .

حضن أنابيب العينات (الجافة) ، والمحلول القياسي ، والبلانك (أنبوبة فارغة) ، في حمام ماء على ٢٥ْم ، وأضف إلى كل منها ٦ مل دليلا ملوناً (حجم من حمض كبريتيك مركز تضاف إلى ٢٠ حجم أنهيدريد حمض الخليك (تحت ١٠ْم) ، ورج واحفظه بارداً ٩ دقائق ، ثم أضف ١٠ حجوم حمض خليك ثلجي ، ودفئ على حرارة الغرفة ، يستخدم في ظرف ساعة واحدة من التحضير) ورج ورجع إلى الحمام المائي ٣٠ دقيقة أخرى ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٦٢٠ ملي ميكرون وقدر تركيز الكوليسترول الكلي مجم / ١٠٠ مل سيرم = (الكثافة الضوئية للعينة X تركيز المحلول القياسي X ٥٠٠) ÷ (الكثافة الضوئية للمحلول القياسي)

ترتفع قيم كوليسترول الدم عادة في أمراض الكلى والبنكرياس والمرارة ، بينما انخفاضها غير معروف ، وإن كانت زيادة نشاط الغدة الدرقية تخفض لحد ما تركيز كوليسترول الدم ، كما تنخفض القيم في حالات الأنيميا وسوء الامتصاص والعدوى الحادة .

د ـ الفوسفوليبيدات في الدم :

تنقل ١٨ مل مخلوط كحول / إيثير ١/٣ إلى أنبوبة ، وبالتنقيط مع الرج يضاف ١ مل

بلازما أوسيرم ، وتخلط ثم توضع في حمام ماء يغلي حتى تغلي محتويات الأنبوبة . برّد الأنابيب إلى حرارة الغرفة ، وأكمل إلى علامة ٢٠ مل بنفس مخلوط الاستخلاص واخلط ثم رشح . انقل ٨ مل راشحاً إلى أنبوبة أخرى ، وجفف بالتبخير على سخان كهربائي . أضف ٢,٥ مل حمض كبريتيك ٥ عياري إلى متبقيات العينة الجافة ، واهضم على سخان كهربائي في وجود نقط من فوق أوكسيد هيدروچين ٣٠٪ . وأكمل إلى حجم معلوم ، ثم قدر الفوسفور بأي طريقة عادية ، واستنتج تركيز الفوسفور ، فهو فسفور الليبيدات بالمليجرام / ١٠٠ مل عينة . ولما كان الليسيثين هو أهم الفوسفوليبيدات من حيث الكم في بلازما الدم ، فإنه بتقدير الفوسفور الكلي وضربه في ٢٥ (حيث يحتوي الليسيثين على حوالي ٤٪ فوسفور) نحصل على تركيز الفوسفو ليبيدات في البلازما .

ويرتبط عادة تركيز فوسفوليبيدات البلازما بتركيز كوليسترول البلازما ، فتزيد الفوسفوليبيدات بزيادة الكوليسترول ، ويظهر ذلك في أمراض الكبد والقناة الصفراوية والبنكرياس .

هـ ـ الأجسام الكيتونية :

الأجسام الكيتونية في الدم والبول (اختبار نصف كمي) :

يحضر مخلوط أملاح من ١ جم صوديوم نيتروبروسيد (ناعم جداً) + ٢٠ جم كبريتات أمونيوم + ٢٠ جم صوديوم كربونات لامائية ، يخلط المخلوط جيداً في هاون ، ويمكن حفظه للاستخدام في مدى عام .

يوضع قليل من هذا المخلوط (بقطر ٥ مم) على ورقة ترشيح ، ثم يضاف عليه نقطة من البول أو السيرم ، يظهر لون بنفسجي نتيجة وجود الأسيتون وحمض أسيتوأسيتيك بأقل تركيز منها (حوالي ١٠ مجم / ١٠٠ مل) ، فإذا ظهر اللون (اختبار موجب) فيخفف البول أو السيرم للضعف ويكرر الاختبار ، فإن ظل موجباً فيخفف أكثر ، ويعاد الاختبار حتى لا يظهر لون ، فإن كان آخر تخفيف يعطي لوناً (١٠ ×) يكون تركيز الأسيتون وحمض الأسيتوأسيتيك حوالي ١٠٠ مجم / ١٠٠ مل .

وقد يحضر هذا المخلوط بخلط جزء من نيتروبروسيد صوديوم مع ١٠٠ جزء من كبريتات أمونيوم بالطحن في هاون، ثم ضع حوالي ١جم من هذا المخلوط في أنبوبة اختبار مع ٥ مل بول والخلط لإذابة الأملاح ، ثم إضافة ٢ مل هيدروكسيد أمونيوم ، فإذا وجد الأسيتون ظهرت حلقة بنفسجية اللون ، فهذا الاختبار حساس لوجود كل من الأسيتون وحمض ثنائي الخليك .

كما يمكن إذابة ٣٠ جم نترات أمونيوم + ٢ جم نيتروبروسيد صوديوم في ٨٠ مل ماء، ووضع ٣ مل بول في أنبوبة اختبار مع ١ مل من هذا الدليل والخلط ثم إضافة ١ مل

نشادر بالتنقيط من قطارة ، فيظهر لون البرمنجنات في حالة إذا ما كان اختبار الأسيتون هذا موجباً .

وتظهر الأجسام الكيتونية في البول نتيجة اضطرابات ميتابوليزم الدهون في حالة مرض السكر ، وفي حالات الجوع الطويلة ، وفي التغذية المفرطة على علائق غنية الدهن فقيرة الكربوهيدرات ، وفي الحميات ، وفي مرض تخزين الجليكوجين ، وفي التسممات ، وعند المعاملة بهرمونات النمو ، وعند زيادة جرعة الحقن بالأنسولين .

تقدير الأجسام الكيتونية ضوئياً في الدم :

يتم ترسيب بروتين الدم مباشرة عقب جمع العينات ، فيؤخذ ١ مل دماً في أنبوبة تحتوي ٢ مل ماء + ٣ مل هيدروكسيد باريوم ٠,١٥ عياري ، وتقلب الأنبوبة عدة مرات، وتترك ساعة لتمام الترسيب ، يضاف بعد ذلك ٣ مل كبريتات زنك (٢,٥ ٪) ، وترج وتطرد مركزياً ، يستخدم الرائق للتقدير .

١ ـ **تقدير الأسيتون** : يؤخذ ٣ مل من رائق العينة في الغرفة الخارجية لوحدة Conway، ويضاف إليها ٣ نقط من حمض الخليك (٢٠ ٪) ، يضاف ٢ مل دليلا (١ ,٠ مل ساليسيل ألدهيد تضاف إلى ٨ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٤ عياري) في الغرفة الداخلية للوحدة ، وتغطي الوحدة وتترك ١٦ ساعة على ٣٠°م . يؤخذ ١ مل من المحلول الملون في الغرفة الداخلية ويضاف إلى ٨ مل ماء ، وتقرأ الكثافة الضوئية على ٤٩٠ نانومتر للعينات المحتوية حتى ٨ مجم / ١٠٠ مل أسيتون ، وعلى ٥٤٠ نانومتر للعينات المحتوية حتى ٨٠ مجم / ١٠٠ مل أسيتون . يجرى عمل تقدير مماثل لمنحنى قياسي لمحاليل أسيتون قياسية .

٢ ـ **تقدير الأسيتون وحمض الأسيتوأسيتيك** : يوضع ٣ مل من رائق العينة (بعد ترسيب بروتينها) مع ٠,٦ مل حمض كبريتيك ٢٠ عياري + ٠,٥ مل ماء في قابلة صغيرة ، وتغلي تحت مكثف عاكس (مع دهان الوصلات بفازلين) ١٠ دقائق ، ثم تبرد بالماء ، ويؤخذ منها ٣ مل لتقدير الأسيتون ، كما سبق عاليه .

٣ ـ **تقدير الأجسام الكيتونية الكلية** : يؤخذ ٣ مل من رائق العينة (بعد ترسيب بروتينها) مع ٠,٦ مل حمض كبريتيك ٢٠ عياري في قابلة ، ويغلي ١٠ دقائق تحت مكثف عاكس .

برد الجهاز ، وأضف إلى العينة ٠,٥ مل ثاني كرومات بوتاسيوم (٠,٥ ٪) بواسطة سرنجة ، سد الجهاز ثانية ، واغل ٣٠ دقيقة تحت مكثف عاكس . برد واخلط وقدر الأسيتون ، كما سبق عاليه .

المحاليل القياسية من البيتاهيدروكسي بيوترات تجرى على صوديوم بيتاهيدروكسي بيوترات ؛ بينما لحمض الأسيتوأسيتيك فتحضر من خلات الإيثيل طازجة التقطير

(٢,٦ مل) بإضافتها إلى صودا كاوية عيارية (٢٠ مل) ، وتحضينها ١,٥ ساعة على ٤٠ْم، ثم التبريد والرج مع الإيثير ٤ مرات لإزالة أي خلات إيثيل متبقية دون تحويل ، ويحمض المحلول المائي بحمض هيدروكلوريك عياري ، ويرج ٤ مرات أخرى مع الإيثير ، يجمع الإيثير ويجفف على كبريتات صوديوم لامائية على ٤ْم ، وبعد ٦ ساعات ترشح المستخلص الإيثيري ويبخر تحت تفريغ على ٣٠-٤٠ْم ، تذاب المتبقيات عديمة اللون في ماء ويكمل إلى لتر، المحلول يحتوي حمض أسيتوأسيتيك مكافئاً تقريباً لمحلول أسيتون ١٤مجم / ١٠٠ مل . احفظ في ثلاجة على ٤ْم ، يعاير بهدمه كمياً مع حمض كبريتيك ٢٠ عياري وتقدير الأسيتون المتكون بنفس الطريقة المذكورة عاليه .

الفرق بين ٢ ، ١ يعطي تركيز حمض الأسيتوأسيتيك بينما الفرق بين ٣ ، ٢ يشير إلى حمض البيتا هيدروكسي بيوتريك .

وتقدير الأجسام الكيتونية في اللبن بورق دليل سابق التجهيز .

وفي الحيوانات الصحيحة يخلو اللبن تقريباً من الأجسام الكيتونية ، وعادة يكون محتوى اللبن حوالي نصف التركيز في الدم ، أي حوالي ٠,٤-٠,٨ مجم / ١٠٠ مل ، بينما في السيرم ١,٩± ٠,٨ مجم / ١٠٠ مل . وبزيادة الأجسام الأسيتونية (كيتونية) في دم الماشية يصاحبه أيضاً زيادتها في كل من اللبن والبول ، وهو دليل اضطراب ميتابوليزم الكربوهيدرات ، وزيادة هدم الدهون . ويصل تركيز الأجسام الكيتونية في البول حوالي خمسة أضعاف ما في اللبن .

و ـ صبغات الصفراء في الدم :

زيادة بيليروبين الدم يدل على وجود انسدادات في القنوات المرارية ، مؤدية إلى إعادة امتصاص المواد الذائبة في الماء والمارة خلال الكبد والمرتبطة به ، فزيادة البيليروبين يصاحبه فشل وظيفي في خلايا الكبد ، أو تحطيم تحليلي لكرات الدم الحمراء . وللتقدير للبيليروبين يجرى التالي :

خفف ٠,٢ مل سيرم أو بلازما إلى ٢ مل بالماء . حضر ٦ أنابيب لتقدير البيليروبين المباشر أو المرتبط في دقيقة وبلانك ، بيليروبين كلي وبلانك ، محلول قياسي وبلانك . أضف إلى الأنابيب ١ ، ٢ ماء مقطرا (٠,٥ مل) ، وإلى الأنابيب ٣ ، ٤ ، ٥ ، ٦ يتم إضافة ٠,٥ مل كحول ميثيل مطلقاً، ثم إلى الأنابيب ٢ ، ٤ ، ٦ مقدار ١ مل دليلا (٦٠ مل حمض هيدروكلوريك مركز / لتر ماء) ، وإلى الأنابيب ١ ، ٣ ، ٥ مقدار ٠,١ مل دليلا (أضف ٦٠ مل حمض هيدروكلوريك مركزاً إلى ٥ جم حمض سلفانيليك وأذب ثم أكمل إلى لتر بالماء ، أذب ٢ جم نيتريت صوديوم في ماء وأكمل إلى ١٠٠ مل ، واحفظه بعيداً عن الضوء ، وقبل الاستخدام مباشرة أضف ١٠ مل من المحلول الأول إلى

٠,٣ مل من المحلول الثاني لتكوين الدليل) ، أضف ٠,٤ مل سيرم مخففاً إلى الأنابيب ١، ٢ ، ٣ ، ٤ واخلط . خفف ٠,٢ مل محلولا قياسياً (أذب ١٠٠ مجم بيليروبين في كلورفورم وخفف إلى ١٠٠ مل في إناء غامق ، واحفظ في ثلاجة لحين تحضير التخفيف النهائي قبل الاستخدام مباشرة ، بتخفيف ١ مل منه إلى ١٠٠ مل بكحول الميثيل فيكون التركيز النهائي ٠,٠١ مجم / مل) إلى ٢ مل بكحول الميثيل المطلق . أضف ٠,٤ مل محلولا قياسياً مخففاً إلى كل من الأنابيب رقم ٥ ، ٦ . بعد دقيقة بالضبط (باستخدام ساعة إيقاف) من الخلط قدر الكثافة الضوئية للأنبوبة الأولى على ٥٤٠ نانومتر مع ضبط الجهاز على محتويات الأنبوبة الثانية .

بعد ١٠ دقائق بالضبط من إضافة السيرم ، قدر الكثافة الضوئية للأنبوبة الثالثة على ٥٤٠ نانومتر مع ضبط الجهاز على الصفر باستخدام محتويات الأنبوبة الرابعة . ثم قدر الكثافة الضوئية للأنبوبة الخامسة على نفس طول الموجة مع تصفير الجهاز على محتويات الأنبوبة السادسة .

احسب تركيز البيليروبين المباشر أي المرتبط في دقيقة بالمليجرام / ١٠٠ مل سيرم =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة (الأنبوبة الأولى)} \times ١}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي (أنبوبة ٥)}}$$

تركيز البيليروبين الكلي مجم / ١٠٠ مل سيرم =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة (أنبوبة ٣)} \times ١}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي (أنبوبة ٥)}}$$

حيث إن المحلول القياسي الميثانولي مساوٍ للبيليروبين المباشر (المرتبط) في دقيقة والكلي.

تركيز البيليروبين غير المباشر مجم / ١٠٠ مل سيرم = تركيز البيليروبين الكلي - تركيز البيليروبين المباشر .

ز ـ هيدروكورتيزون البلازما :

لما كانت ستيرويدات غدة قشرة الأدرينال تتدخل في ميتابوليزم المعادن والكربوهيدرات ، وهذه الإستيرويدات تدور مع الدم في الجسم وتخرج في البول ، فتقديرها يدلل على وظيفة قشرة الأدرينال (كمكان لتخليقها) وكفاءتها .

انقل ٥ مل بلازما (عينة بعد صيام) إلى ٢٥ مل ثنائي كلوروميثان ، ورج بشدة ١٥ ثانية ، أضف ٢ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,١ عياري إلى مستخلص ثنائي كلوروميثان بعد فصل البلازما ورج بشدة ٢٠ ثانية ، واترك لفصل الطبقات ، أهمل الطبقة المائية . انقل

١٠ مل مستخلص ثنائي كلوروميثان إلى أنبوبة اختبار ، وأضف إليها ٠,٢٥ مل دليل لون (أذب ٥٠ مجم فينيل هيدرازين هيدروكلوريد في ٥٠ مل مخلوط حجمين ، حمض كبريتيك ٦٤٪ مع حجم كحول إيثيل ، يحضر طزجاً يومياً) ورج بشدة ١٥ ثانية ، واترك ٣٠ دقيقة . اعزل واهمل الطبقة العليا ، واترك الطبقة المائية ٨ ـ ٢٤ ساعة على حرارة الغرفة لتطوير اللون .

عدّ بلانك على ٥ مل ماء بدلاً من البلازما ، وعدّ كذلك محلولاً قياسياً (أذب ١٠٠ مجم هيدروكورتيزون في ١٠٠ مل كحول مطلقاً ، وخفف منه ١ مل إلى ٢٠٠ مل بالماء ، فيحتوي ٥ ميكروجرام هيدروكورتيزون / مل) بأخذ ١ مل منه + ٤ مل ماء وأكمل كما في العينة والبلانك .

قدر الكثافة الضوئية على ٤١٠ نانومتر لتقدير تركيز الهيدروكورتيزون بالميكروجرام / ١٠٠ مل بلازما = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ١٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$

ولمزيد من الاطلاع يرجع إلى المراجع التالية :

– شريف صادق إبراهيم (١٩٧١) : مذكرة أساسيات الكيمياء الحيوية والتحليلية والجزء العملي ـ المنصورة .

– عبد القادر راشد أبو عقادة ، مصطفى محمد أبو النجا (١٩٧٠) : طرق التحليل الغذائي – دار المعارف بالأسكندرية .

– فتحي أحمد عبد الحافظ (١٩٦٦) : الكيمياء التحليلية الكمية – دار الهنا للطباعة .

– مصطفى صفوت محمد (وآخرون) (١٩٦٣) : كيمياء وتحليل الأغذية ـ دار المعارف بالاسكندرية .

ـ مصطفى مرسي (وآخرون) (١٩٦٨) : أساسيات البحوث الزراعية ـ مكتبة الأنجلو المصرية .

- Block, H. J. & Weissbach, F. (1982) Arch. Tierernahrung, 32: 693 .

- Bottcher, W. (1982) Arch. Tierernahrung, 32 : 287 .

- Close, W. & Menke, K. H. (1986) . Selected topics in animal nutrition . Deuschestiftung fur Internationale Entwicklung, Feldafing, Germany .

- Egan , H. etal (1981) pearson's Chemical Analysis of Foods . 8 th Ed., Churchill Livingstone, Edinburg & London .

- Elmer , H. M . (1978) Standard methods for the examination of dairy products . 14 th Ed . American public health Association , Washington .

- Erwin , E. S . et al . (1961) J . Dairy Sci., 44 : 1768.

- Folch, J. et al . (1957) J. Biol . Chem. 22 6 : 497 .

- Gruber, P. (1961) Die Bodenkultur, 12 : 332 .

- Gruenwedel, D. W. & Whitaker, I. R. (1985). Food an alisis, Vol.3, Marcel Dekker, N. Y.

- Holme, D. G. & Peck, H. (1993) . Analytical Biochemistry . 2 nd. Ed., Longman, printed in singapore .

- J. AOAC (1975) Food Analysis , 3 rd Ed., Leonard Hill Book , London .

- Leitgeb, R. (1979) Futtermittelkunde, Vorlesungen, Univ. F. Boku., Wien .

- Lowry , R. R. & Tinsly , I . J. (1976) J. AOCS, 53 : 470 .

- Merck, E. (1974) Klinisches Labor , 12 . Auflage , Merck, Darmstadt.

- Merck, E. (1976) Labordiagnostik in der Tiermedizin , Merck, Darmstadt .

- Merck , E. (1980) Arbeitsanleitungen für die klinisch Chemie . Diagnostica , Merck, Darmstadt .

- Meyer, H. et al . (1980) Supplemente zu Vorlesungen und übungen in der Tierernahrung. 5 . Auflage, Sprungmann Verlag, Hannover

- Oser, B. L. (1979) Hawk's physiological chemistry . 14 th Ed., Tata Me Graw - Hill , N. Y.

- Procos, J. (1961) Clin . Chem . , 7 : 79 .

- Ramsey , H. A. (1963) J. Dairy Sci., 46 : 480 .
- Sanderson , P. (1986) In : Haresign, W. & Cole , D. J. A. (ed) Recent Advances in Animal Nutrition. Butterwarths, London .
- Schmit . M. (1981) Laboruntersuchungen - Veterinarmedizin . Boehriger , Mannheim .
- Soliman, M . K. & Abd El Moty, I. (1979) A modern approach to veterinary clinical & laboratory Diagnosis . The scientific Book Centre , Cairo .
- Stein , E. A. (1986) In : Tietz , N. W. (ed) Textbook of clinical Chemistry , Saunders, Philadelphia .
- The Feeding stuffs (Sampling and Analysis) Regulations 1982 (1982) Agriculture 1982 No 1144 . Her Majesty's Stationery Offic , London .
- Varley , H. (1978) Practical Clinical Biochemistry . 4 th Ed., Arnold - Heienmann , India .
- Watson , D. (1960) Clin . Chim . Acta , 5 : 637 .
- Wells, B. B. (1962) Clinical Pathology . 3 rd Ed. , Saunders, Philadelphia & London .
- Wootton, I. O. P. (1974) Microanalysis in Medical Biochemistry, 5 th Ed . , Churchill, London .
- Woyewoda , A. D. etal. (1986) Can. Tech. Rep. Fish. and Aquatic Sci. No 1448 .

الفصل الثالث

البروتينات والمركبات النيتروچينية

يوجد الأزوت بشكل كبير في صورة عضوية ، والقليل منه في صورة نشادر ونترات ونيتريت خاصة في الأعلاف النباتية . ويشمل هذا القسم البروتينات البسيطة والمركبة والمشتقة ، ونواتج انحلالها وهدمها من ببتيدات وأحماض أمينية وأميدات وكرياتنين وكرياتينين وبيرميدين وبيورين (سواء حرة أو ضمن تركيب مركبات كالأحماض النووية والڤيتامينات والقلويدات والجليكوزيدات والفسفوليبيدات والصبغات والإنزيمات) .

ويقدر النيتروچين بغرض تقدير البروتين الخام Crude Protein ، لكون البروتين أهم المركبات الأزوتية وأكثرها وجوداً . ونظراً لأن معظم البروتينات تحتوي ١٦ ٪ نيتروچين ، فبضرب النيتروچين المقدر في مادة ما × ٦,٢٥ $\left(\frac{١٠٠}{١٦}\right)$ نحصل على النسبة المئوية للبروتين في العينة .

ويقدر النيتروچين بالحرق الجاف (في جومن CO_2 ومادة مؤكسدة كأكسيد النحاس في أنبوبة احتراق ، ويقاس غاز النيتروچين بجهاز Nitrometer ، وهي طريقة غير عملية لاحتياجها كثير من الوقت وهي صعبة الأداء) ، أو بالتسخين مع قاعدة (وهي غير مستعملة في التحليل الغذائي ؛ لأن بعض المركبات الأزوتية لا تعطي نشادراً مع الصودا الجيرية) ، أو بطريقة كلداهل وهي المستعملة في التحليل الغذائي وتتلخص في هضم المادة رطباً بحامض قوي (كبريتيك أو مخلوط مع البيركلوريك ، أو مع الفوسفوريك) يتحول على أثرها الأزوت إلى كبريتات أمونيوم . وتتلخص طريقة كلداهل فيما يلي :

١ ـ الهضم :

بأكسدة المادة العضوية إلى المكونات المختلفة مثل CO_2 ، H_2O ، NH_4 ، $(NH_4)_2SO_4$ ، وتتحول المعادن إلى أملاح كبريتات ، وذلك بحمض الكبريتيك ، ولا يفضل استخدام حمض البيركلوريك لأنه مؤكسد قوي ، فيؤدي إلى فقد بعض الأزوت فلا يستخدم إلا مع المواد المقاومة للأكسدة . وقد يستخدم H_2O_2 كذلك كعامل مؤكسد .

ويحتاج الهضم إلى عوامل مساعدة Catalysts ككبريتات البوتاسيوم (لا تزيد عن ١٠ جم لكل ٢٥ مل حمض كبريتيك مركزاً ، وإلا تجمدت الكتلة بعد التبريد من الهضم) لرفع درجة الغليان ، وقصر وقت الأكسدة ، أو قد يستخدم كبريتات نحاس (كبر تركيزها يكون معقداً مع الأمونيا صعب التحلل) ، أو الزئبق (يتحد كذلك مع الأمونيا فيلزم إضافة ثيوكبريتات صوديوم لتكسير المعقد ، أو يخلط الزئبق مع كبريتات النحاس) ،

والأفضل استخدام مخلوط كبريتات بوتاسيوم / كبريتات نحاسيك (٩٥/ ٥) ، أو كبريتات نحاسيك / أكسيد زئبقيك (٠,٧/١) ، أو كبريتات النحاس / كبريتات بوتاسيوم (٤/١) + ٠,٥٧ جم أكسيد سيلينيوم أو ١,٨ جم سلينات صوديوم / ٤٠٠ جم مخلوطاً . ويستمر الهضم ٦ – ٨ ساعات ، أو حتى يروق المحلول ، إذ إن خفض مدة الهضم لا يتحول معها كل الأزوت بالعينة إلى أمونيا ، كما إن زيادة مدة الهضم يؤدي إلى فقد في الأمونيا .

٢ ـ التقطير :

بعد الهضم يترك الدورق يبرد ثم يجفف بحذر بماء مقطر (مع ترسيب الزئبق أو أكسيد الزئبقيك إذا استعملا كعاملين مساعدين وذلك قبل إضافة القلوي ، وإلا اتحدا مع الأمونيا مكونين معقدات ؛ لذا يرسبان أولاً بإضافة ٢٥ مل أو أكثر من كبريتيد بوتاسيوم ، أو صوديوم ٤ ٪ ، أو ثيوكبريتات صوديوم ٨ ٪) مع إضافة خارصين محبب أو حجر خفاف لمنع الانفجارات أثناء الغليان مع ٠,٥ جم زيتاً معدنياً لمنع الفوران Frothing خاصة في وجود الدهن ، ثم إضافة القلوي ١٢ عياري أو مشبعاً مع عدم زيادته ، منعاً للنقل الميكانيكي للقلوي أثناء التقطير ، ويوصل الدورق بمكثف عن طريق مصيدة Trap تمنع وصول رذاذ الصودا الكاوية إلى المكثف أو إلى القابلة . امزج الدورق بالهز مع الحذر ، ويجرى التقطير حتى انتهاء تصاعد النشادر (١٥٠ مل متقطراً أو تغيير لون محتويات الدورق بالهز من الأزرق إلى البني في نهاية مدة التقطير لتطاير الأمونيا وتكوين هيدروكسيد ثم أكسيد نحاسيك (إذا استخدم النحاس كعامل مساعد) أو لمدة ساعة .

٣ ـ التنقيط :

يستقبل المتقطر في حجم معلوم من حامض معلوم القوة مع دليل مناسب ، ويجب أن تكون الأنبوبة التي تصل بالمكثف طرف القابلة مزودة بانتفاخ ، ويغمر طرف الأنبوبة في الحامض ، حتى إذا شفط الحامض من الدورق لا ينتقل إلى المكثف ودورق الهضم ، ويجب أن تكون كمية الحامض بالقابلة أكبر من كمية الأمونيا المتقطرة .

بعد التقطير يغسل طرف الأنبوبة على القابلة ، وينقط الحامض الزائد للمعادلة ومن ذلك تحسب كمية الأمونيا المتولدة . وقد يستخدم حمض بوريك H_3BO_3 ٥ ٪ مع دليل برتقالي ميثيل أو أحمر كونجو لاستقبال الأمونيا ، وحجم الحامض هنا ليس له تأثير فلا داع لقياس كميته بالضبط ، فتتفاعل الأمونيا مع البوريك مكونة ميتابورات أمونيوم .

$$NH_4 + H_3BO_3 \longrightarrow (NH4)_3\ BO_3$$

يتم معادلتها بحمض Hcl معلوم العيارية مباشرة .

ويجرى حساب مقدار الأزوت من مكافئات النشادر المتولدة .

ورغم اعتمادنا الكبير على طريقة كلداهل هذه منذ عام ١٨٨٣ وحتى اليوم وغداً ، إلا

أنها لا تخلو من العيوب التي نحصرها في التالي :

١ ـ المعامل ٦,٢٥ لتحويل الأزوت إلى بروتين يحمل نسبة خطأ ترجع إلى أن المواد المختلفة تحتوى مواداً أزوتية غير بروتينية ، مثل الأمونيا والأحماض الأمينية التي ترتفع فيها نسبة الأزوت إلى أكثر من ٨٠٪ ، وبذلك فالمعامل ٦,٢٥ يعطي تقديرا خاطئاً في هذه الحالات .

٢ ـ نسبة الأزوت في البروتينات المختلفة ليست ثابتة بل تختلف كذلك في البروتين الواحد على حسب تصحيح التقدير بالنسبة للرطوبة أو للرماد .

٣ ـ من الصعوبات كذلك اختيار أحسن العوامل المساعدة (المسرعة للهضم والأكسدة لقابليتها حمل الأوكسچين) بأفضل النسب ، وكذلك تحديد أنسب مدة هضم لا تؤدي إلى أخطاء في التقدير .

وعموماً لا ضرر كبير في استعمالها في مواد العلف التي ستتغذى عليها الحيوانات المجترة لاستفادتها من المواد الأزوتية غير البروتينية .

وفيما يلي بعض طرق تقدير الأزوت :

١ ـ طريقة الماكرو كلداهل Macro Kjeldahl للمواد الغذائية :

ويجرى كالتالي :

١ ـ زن ١ جم مادة غذائية بالضبط على ورقة ترشيح ، وانقلها إلى دورق هضم (دورق كلداهل) جاف (على ألا يعلق شيء منها برقبة الدورق) سعة ٥٠٠ مل .

٢ ـ أضف ببطء وحذر من مخبار حوالي ٢٠ مل حمض كبريتيك مركزاً على جدران الدورق ليأخذ منه ما قد يعلق من العينة على رقبة الدورق . رج لخلط العينة بالحمض واترك الدورق ١٠-١٥ دقيقة .

٣ ـ أضف نقطة واحدة من الزئبق كعامل مساعد ، وارفع الدورق على حامل جهاز الهضم بخزان الغازات .

٤ ـ ابدأ التسخين بلهب هادئ ، وارفع الدورق عند حدوث فوران ، مع رجه دائرياً في مستوى أفقي باحتراس حتى يهبط المحلول إلى القاع ، فيعاد الدورق على اللهب مع ملاحظته .

٥ ـ سخن ١٥ دقيقة بعد انتهاء الفوران ، ثم أضف ١٠ جم كبريتات بوتاسيوم أو صوديوم لا مائية لرفع درجة الغليان .

٦ ـ استمر في التسخين الهين حتى بدء ظهور تغيير في لون المادة وظهور أبخرة بيضاء لحمض الكبريتيك ، بعد ذلك سخن بلهب قوي حتى تبيض محتويات الدورق ، واستمر في التسخين لمدة ساعة بعد ذلك .

٧ ـ أطفئ اللهب ، واترك الدورق يبرد لحد ما (لا يبرد نهائياً فتجمد المادة وتلتصق بالقاع) .

٨ ـ أضف قليلاً من الماء المقطر باحتراس (إذا كانت المادة لاصقة بالقاع فسخن أولاً على لهب ضعيف حتى الغليان والتفتت) .

٩ ـ انقل محتويات الدورق كمياً باحتراس إلى دورق التقطير ، ثم يغسل الدورق بالماء وينقل ماء الغسيل كمياً إلى دورق التقطير ، ويستمر الغسيل حتى خلو الغسيل من الحموضة ، وألا يتعدى الحجم الكلي النهائي ٢٥٠ مل .

١٠ـ ضع قطعاً صغيرة من الحجر الخفاف أو الفخار لتنظيم الحرارة ومنع الفوران (أو قطع الزنك التي تمنع الغليان الانفجاري لتوليدها للهيدروچين) .

١١ـ جهز دورق استقبال (قابلة) بها ٢٥ مل حمض كبريتيك ٠,٢ عياري معلوم القوة بالضبط + نقطتي دليل أحمر ميثايل ، على أن تظل أنبوبة التوصيل منغمسة في الحامض باستمرار وأثناء فترة التقطير .

١٢ـ يخلط ١٢٠ مل هيدروكسيد صوديوم ٤٣٪ (٤ مل / ١ مل حمض كبريتيك مركز) لمعادلة الحامض المركز وطرد النشادر ، مع ٢٥ مل كبريتيد صوديوم أو بوتاسيوم ٤٪ لكل نقطة زئبق .

١٣ـ يضاف المخلوط السابق لدورق التقطير بسرعة بواسطة قمع ذي ساق واسعة طويلة ، ويسد الدورق بسرعة ويوصل جهاز التقطير .

١٤ـ سخن تسخيناً هيناً مستمراً ، وتستمر عملية التقطير لمدة نصف ساعة أو انتهاء خروج غاز الأمونيا (يكشف عن انتهاء خروج غاز الأمونيا بغمس طرف أنبوبة التوصيل في محلول نسلر) ، افصل دورق الاستقبال أولاً ثم أطفئ اللهب .

١٥ـ اغسل أنبوبة التوصيل أسفل المكثف بماء مقطر على القابلة ، وعادل الحامض الباقي بها بواسطة هيدروكسيد صوديوم معلوم القوة واحسب النتروچين كالتالي :

ـ عدد مكافئات حمض الكبريتيك بالقابلة = عدد مكافئات الأمونيا المتصاعدة من العينة + عدد مكافئات هيدروكسيد الصوديوم المستعملة في التعادل الرجعي .

ـ وزن الأمونيا جم = عدد مكافئات الأمونيا + الوزن المكافئ للأمونيا .

ـ وزن النيتروچين جم = وزن الأمونيا × ١٤ / ١٧ .

ـ وزن البروتين جم = وزن النيتروچين × ٦,٢٥ .

ملاحظات على الطريقة السابقة :

١ ـ يجب خلو جميع الكيماويات المستخدمة من عنصر النتروچين ، وتجرى تجربة خاوية باستخدام ١ جم سكر قصب بدلاً من العينة ، وتعامل كالعينة ويخصم ما يستخرج

معها من أزوت من العينات .

٢ ـ إضافة كبريتور البوتاسيوم أو الصوديوم في دورق التقطير لترسيب الزئبق المستعمل كمادة مساعدة في الهضم فى صورة كبريتور زئبق .

٣ ـ بمزج هيدروكسيد الصوديوم والكبريتور وإضافتهما معاً ، لأنه لو أضيفت الصودا الكاوية أولاً والكبريتور ثانياً يحتمل حدوث فقد في النشادر خلال الفترة بين الإضافتين ، وإضافة الكبريتور أولاً والصودا ثانياً يؤدي لتفاعل الكبريتور مع الحامض وينتج غاز كبريتور الهيدروچين ويمر لدورق الاستقبال ويختلط بالحامض الذي به فيغير من قوته .

٤ ـ يمكن استخدام وزنة عينة ٠,٥ – ٥,٠ جم حسب محتواها الأزوتي . ولعدم الفقد في العينة يمكن وزنها على ورقة ترشيح ووضعها بورقة الترشيح للهضم .

٥ ـ بدلا من الزئبق يمكن استخدام ١٠ جم كبريتات بوتاسيوم وعدة بلورات كبريتات نحاس كعامل مساعد .

٦ ـ في الحساب كل ١ مل ٠,١ عياري H_2SO_4 = ٠,٠٠١٤ جم نيتروچين .

ولاختصار وزن العينة وكمية الكيماويات ووقت التقطير يجرى التقدير كالتالي .

٢ ـ الميكرو كلداهل Micro kjeldahl :

١ ـ زن ورقة سجاير بالضبط ، وضع بها حوالي ٠,٠٣ جم مسحوق عينة بالضبط ، ثم تنقل إلى دورق هضم كلداهل سعة ٥٠ مل .

٢ ـ أضف ٢ مل $H_2 SO_4$ مركزاً وسخن حتى تتصاعد الأبخرة السوداء ثم اتركه يبرد .

٣ ـ أضف ٠,٣جم مسحوق حديد مختزلا + ٠,٣جم مخلوط هضم ثم ٤ مل $H_2 SO_4$ مركزاً ، ثم ضعها على لهب لمدة ١,٥ ساعة ، أو حتى يروق المحلول .

٤ ـ ضع ١٠ مل حمض بوريك ٤٪ في دورق مخروطي سعة ١٠٠ مل + ٣–٤ نقط دليل وثبته أسفل مكثف جهاز التقطير .

٥ ـ انقل مكونات دورق الهضم كمياً إلى جهاز التقطير مستخدماً الماء المقطر .

٦ ـ أضف ٢٠ مل Na OH ٤٠٪ ، واسمح لبخار الماء بالمرور في العينة واجمع المتقطر ٧–١٠ دقائق حتى تمام طرد الأمونيا (حجم الصودا يتناسب مع حجم الحامض المركز في الهضم) .

٧ ـ اسحب الدورق المخروطي ، واغسل الساق المتصل بالمكثف والمغموسة فيه بالماء المقطر، ثم أبعد اللهب استعداداً لعينة أخرى بعد سحب مكونات العينة السابقة إلى البالوعة.

٨ ـ أجر عملية التعادل بالتنقيط لمحتويات الدورق المخروطي بحامض مخفف ٠,٠١٤٣ عياري واحسب تركيز النيتروچين بالعينة بعد طرح التجربة الخاوية Blank .

٩ ـ كـل ١ مـل $H_2 SO_4$ (أو HCl) ٠١٤٣, ٠ عيـاري = ٠,٢ ملليجـرام أزوتـا أو ١ مليمكافئ حامض = ٠,٠١٤ جم أزوتا .

٪ نيتروچين = عدد ملليلترات الحامض×عيارية الحامض×٠,٠١٤×١٠٠/وزن العينة جم .

= عدد ملليلترات الحامض ٠١٤٣, ٠عياري بالضبط×٠,٢×١٠٠/وزن العينة جم×١٠٠٠ .

ملاحظات :

حامض البوريك يكون تركيزه ٢-٥ ٪ بالذوبان في الماء المقطر مع التسخين قليلاً لتمام الذوبان .

مخلوط الهضم مكون من كبريتات نحاس + كبريتات بوتاسيوم بنسبة ٣:١ وزناً ، مع طحنها قبل خلطهما .

دليل بروموكريزول جرين + أحمر ميثايل بنسبة ٢ :٣ حجماً . تركيز البروموكريزول جرين ٠,١ ٪ وأحمر الميثايل ٠,٠٢ ٪ والمذيب كحول إيثايل ٦٠ ٪ .

حمض $H_2 SO_4$ ٠,٠١٤٣ عياري يحضر بإضافة ٠,٣٨ مل $H_2 SO_4$ مركز / لتر ماء مقطر مع ضبط العيارية بكربونات الصوديوم اللامائية .

دليل حمض البوريك يحضر بإذابة ٢٠مجم دليل أحمر ميثيل + ٦٠ مجم دليل أخضر بروموكريزول في ١٠٠ مل كحول إيثايل . يذاب ٤٠ جم بلورات حمض بوريك في ٤٠٠ مل ماء مقطراً مع الرج الشديد . يخلط محلول الدلائل ومحلول الحمض ويضاف إلى المخلوط ١٥٠٠ مل كحول إيثايل .

الفرق المسموح به بين مكررتي التقدير يجب ألا يتعدى ٠,٢ ٪ مطلقاً في حالة نقص البروتين الخام عن ٢٠ ٪ ، ويجب ألا يتعدى هذا الفرق عن ١,٠ ٪ نسبياً في حالة نسبة البروتين الخام في العينة ما بين ٢٠-٤٠ ٪ ، وألا يتعدى هذا الفرق عن ٠,٤ ٪ مطلقاً في حالة زيادة البروتين الخام بالعينة عن ٤٠ ٪ عموماً يجب ألا يزيد الفرق عن ٣-٥ ٪ من متوسط قيمتي التقدير .

هذا وهناك تكنيك بسيط آخر لقياس العناصر الهامة الغذائية في الأعلاف والنباتات ، بتحضير مستخلص منها بالهضم المبتل ، أي بأكسدة مادتها العضوية باستخدام فوق أوكسيد الهيدروچين ، مع تحويل الأزوت إلى كبريتات نشادر كالتالي :

تحضير مستخلص نباتي :

بهضم ٠,١ - ٠,٢ جم عينة جافة مطحونة مع ١ مل يد٢ كب أ٤ مركزاً ، وبعد تصاعد الغازات يبرد الدورق ويضاف ١ مل محلول كبريتات نحاس ١ ٪ + ٤ مل حمض

كبريتيك مركزاً وتسخن حتى تسود العينة ، فتترك لتبرد ، ونقط بـ H_2O_2 ٥ نقط ثم سخن، وكرر إضافة H_2O_2 حتى تروق العينة ، فأكمل لدورق معياري . أو قد يجرى تحضير هذا المستخلص كالتالي :

تقطع العينة النباتية بحيث لا يزيد سمكها عن ٢ م تقريباً بشفرة حادة ، ثم يوزن منها ٣ جم في كأس ١٠٠ مل، ويضاف إليها ٣ مل محلول مورجان Morgan's Reagent (٣٠ مل حمض خليك + ١٠٠ جم خلات صوديوم تذاب حتى لتر ماء مقطر)+ $\frac{1}{2}$ جم فحماً حيوانياً نشطاً ، وتقلب لمدة ١٥ دقيقة ، ثم يرشح وينقل الراشح إلى دورق معياري ويكمل بالماء . يؤخذ من هذا المستخلص لتقدير الأزوت الكلي (من المستخلص الأول) ضوئياً باستخدام دليل نسلر ، أو لتقدير الأزوت النتراتي (من المستخلص الثاني) بدليل Phenol disulphonic acid ضوئياً ، كذلك يقدر في هذه المستخلصات كل من الصوديوم والبوتاسيوم والفوسفور والكالسيوم والماغنسيوم .

٣ ـ طريقة نسلر :

ولتقدير الأزوت بطريقة نسلر يحضر أولاً محلول نسلر بوزن ٣٧,٥ جم يوديد بوتاسيوم ، تذاب في ٢٥ مل ماء مقطراً ، ٢٨,١ جم يودا ، تذاب في محلول اليوديد السابق + ٣٧,٥ جم زئبقاً يرج الكل في دورق معياري جيداً حتى ظهور اللون الأحمر الفاتح ، ثم برده أسفل تيار ماء بارد ، مع الرج الدائري حتى ينفرد الزئبق ويصفر اللون بخضار . صب المحلول المكون من يوديد البوتاسيوم ويوديد الزئبق (بحيث يستبعد الزئبق المنفرد) في دورق معياري ٢٥٠ مل ، وأكمل بالماء المقطر للعلامة . أضف محتويات الدورق السابق إلى ١٢١٩ مل NaOH ١٠ ٪ خالية الكربونات .

ويحضر محلول قياسي من النيتروجين المعلوم التركيز بإذابة ٠,٤٧١٤ جم كبريتات أمونيوم نقية جافة في لتر ماء مقطر يعطي محلول تركيز الأزوت فيه ١٠٠ جزء في المليون.

وللتقدير : يؤخذ ١ مل من كل من العينة ، المحلول القياسي ، الماء المقطر (Blank) كل في أنبوبة ، ويوضع بكل أنبوبة ٢ مل ماء مقطراً ، ثم ٢ مل محلول نسلر مع الرج ، وقراءة الكثافة الضوئية Colorimetric على طول موجة ٤٨٠ ميكرون ، بضبط صفر الجهاز على Blank ، وبمعلومية تركيز والكثافة الضوئية للمحلول القياسي والكثافة الضوئية للعينة تستخرج كمية الأزوت بالعينة وتحول لنسبة بروتين .

٤ ـ البروتين الخام القابل للهضم معملياً :

وفي هذا التكنيك يتم تقدير البروتين الخام القابل للهضم بواسطة البيبسين وحمض الهيدروكلوريك تحت ظروف معينة .

فيوزن حوالي ٢ جم مادة غذائية بالضبط في كأس سعة ٦٠٠ مل + ٤٨٠ مل ماء

مقطراً + ١ جم ببسين (٢٠٠٠ وحده / جم) + ١٠ مل حمض HCl ٢٥٪ . يحفظ هذا المعلق في حضان أو على حمام مائي على درجة ٤٠ْم للتحضين لمدة ٢٤ ساعة ، بعدها يضاف ١٠ مل أخرى من حمض HCl ٢٥٪ ، ويحضن لمدة ٢٤ ساعة أخرى . يحتوي المحلول حوالي ١٪ HCl ، ودرجة الحموضة يجب أن تكون أقل من ١,٧ . أثناء التحضين يتم خلط العينة ٥ مرات بالتقليب . بعد التحضين السابق هذا (٤٨ ساعة) يتم الترشيح على ورق تشريح خشن ، ويتم الغسيل بالماء المقطر الساخن حتى يصبح الراشح متعادلاً (باستخدام ورق الدليل) . تنقل ورقة الترشيح بالراسب لتقدير الأزوت بطريقة كلداهل المعتادة وذلك لحساب كمية الأزوت غير المهضوم ، وضربها في ٦,٢٥ لتقدير البروتين الخام غير المهضوم .

٪ بروتين خام كلي - ٪ بروتين خام غير مهضوم = ٪ بروتين خام مهضوم .

معامل هضم البروتين الخام = ٪ بروتين خام مهضوم / ٪ بروتين خام كلي .

٥ - البروتين الحقيقي :

وهو من الأهمية لأن جزءاً من البروتين الخام (وهو الجزء غير الحقيقي أو المكونات الأزوتية غير البروتينية Non protein - Nitrogen) في مواد العلف تستفيد منه المجترات ، بينما لا تستفيد منه الحيوانات وحيدة المعدة ؛ لذا كان من المهم للحيوانات الأخيرة تقدير البروتين الحقيقي الذي تستفيد منه هذه الحيوانات في مواد العلف .

وتبني هذه الطريقة على أن المواد الأزوتية غير البروتينية لا ترسب بإضافة هيدروكسيد النحاس ، بل ما يرسب هو البروتين الحقيقي الذي يقدر فيه الأزوت لتقدير البروتين الحقيقي بطريقة كلداهل . وأبسط طرق تقدير البروتين الحقيقي تجرى بأخذ وزنة من مادة العلف حوالي ١ جم بالضبط في كأس + ٥٠ مل ماء مقطراً ، ويغلي الكأس بمحتوياته مع التقليب المستمر (في حالة الأعلاف النشوية تغلى على حمام مائي ١٠-٢٠ دقيقة خوفاً من الفوران) . بعد انتهاء الغليان يضاف ٢٥ مل محلول كبريتات نحاس (٦٠ جم / لتر) ثم ٢٥ مل محلول هيدروكسيد صوديوم (٦,٥ جم / لتر) مع استمرار التحريك . يترك الكأس حتى يتم الترسيب ثم يختبر لوجود النحاس (بمحلول سيانور حديدوز وبوتاسيوم) في عينة من السائل الرائق ، يجب أن يكون المحلول الرائق حامضياً . انقل الراسب كمياً إلى ورقة ترشيح ، واغسل الراسب جيداً بماء ساخن حتى يخلو الراشح من الكبريتات (بتكوين راسب على كلوريد الباريوم) انقل ورقة الترشيح بما عليها من راسب إلى دورق كلداهل، واهضم وقدر الأزوت واضربه في ٦,٢٥ للحصول على كمية البروتين الحقيقي .

ملاحظات عامة على تقدير البروتين :

١ - يراعى ترتيب فتح وغلق محابس جهاز الماركهام للتقطير (للميكرو كلداهل) ، وبعد انتهاء تقطير عينة واستبعاد دورقها المستقبل للمتقطر ، يمنع مرور البخار من الجهاز

بالضغط على الوصلة الكاوتشوك بين دورق البخار والجهاز بماسك ، ثم فتح فوهة البخار لخروجه للخارج ، مع إنزال كمية من الماء المقطر من فتحة العينة ، وتقفل ثانية ليحدث شفط ، وتغسل العينة إلى اتجاه فتحة البالوعة ، ويكرر إضافة الماء من فتحة العينة ، والصرف من فتحة البالوعة لتصريف الناتج من الغسيل .

٢ ـ قد يتم الهضم بنقع العينة الموزونة في ٤ مل H_2SO_4 مركزاً لمدة ١٢ ساعة ، ثم على حمام رملي لمدة ٢ ساعة ، وتبرد ويضاف ١ مل مخلوط أحماض مركزة من الكبريتيك / بيركلوريك (١/١) وإكمال الهضم .

٣ ـ هناك طريقة أوتوماتيكية (آلية) معتمدة على نفس فكرة وأساس طريقة كلداهل باستخدام جهاز Kjel - Fass Automated Macro Kjeldahl Analyzer والذي يعمل بكفاءة ٢٠ عينة / ساعة واستخدم بكثرة في المواد الغذائية .

٤ ـ طريقة لونية سريعة مستخدمة في الأغذية المختلفة، باستخدام تفاعل البيوريت Biuret Reaction في وجود قلوي ، فيخلط ٥٠٠ مل محلولا مائياً من كبريتات النحاس (٣٪) مع ٥٠٠ مل محلولاً مائياً طرطرات كالسيوم وصوديوم (١٢٪) ، ثم يضاف مع التقليب ٥٠٠ مل محلولاً مائياً من هيدوركسيد كالسيوم (١١,٢٪) . يضاف لهذا المخلوط ٤١ مل ماء مقطراً + ٤١ مل أيزوبروبيل ، ١٠٠ مل من المخلوط تخلط مع ٢ جم مسحوق عينة وتحفظ على ٧٠°م لمدة ٤,٥ دقيقة ، ثم ترشح وتقاس كهروضوئياً على ٥٥٠ نانومتر .

٥ ـ يمكن تقدير الأزوت غير البروتيني بإضافة ٢٠ مل ماء مقطراً إلى ٢٠ جم عينة في أنبوبة اختبار + ٥ جم حمض ٥٠٪ Trichloroacetic acid ، واطرد مركزياً لمدة ١٠ دقائق على ٢٠٠٠ لفة / دقيقة ، واسحب ١٠ مل رائق إلى دورق كلداهل كتقدير الأزوت عادياً، وذلك لحساب الأزوت غير البروتيني غير المترسب بحمض ثلاثي كلوروخليك .

٦ ـ معامل تحويل الأزوت إلى البروتين معامل افتراضي لمتوسط محتوى البروتينات المختلفة من الأزوت ، ويستعمل للتبسيط إلا أنه في الواقع عبارة عن :

٦,٧٠	لبياض البيض	٦,٢٥	لمواد العلف
٦,٦٢	لصفار البيض	٦,٣٨	بروتين اللبن
٦,٦٨	للبيض الكلي (أو المجمد)	٦,٠٠	لمنتجات الصويا
٥,٧٢	للسمك	٥,٧٠	دقيق القمح (قمح)

٦,٢٥ للبروتين (بوجه عام) ، بينما بالنسبة لمحتوى اللحوم فإنه يمكن حساب البروتين في صورة لحم أحمر كنسبة مئوية = $\frac{\text{٪ للنيتروجين الكلي في اللحم} \times ١٠٠}{\text{عامل}}$

وهذا العامل = ٣,٣٥ للعجول الرضيعة
٣,٥٥ للبقر
٣,٧ للدجاج (كامل)
٣,٦ لعضلات الورك للدجاج
٣,٩ لعضلات الصدر للدجاج
٢,٧ للكُلى
٣,٠ للسان
٣,٦٥ للرومي (كامل)
٣,٥ لعضلات ورك الرومي
٣,٩ لعضلات صدر الرومي
٣,٥٥ للكبد .

كما يمكن حساب اللحم الأحمر في البقر من تحليل النيتروچين الكلي (٪) والدهن (٪) والكربوهيدرات (٪ بالفرق) من المعادلة :

٪ لحم أحمر = [١١٢,٥ (٪ نيتروچين كلى) - ٠,٤٤٣٧ (محتوى الدهن ٪) - ٢,٢٥ (كربوهيدرات جافة ٪)] / ٣,٥٥

٦ - البروتين في السمك :

يشكل البروتين في السمك الحي أهم المكونات المسؤولة عن التركيب الطبيعي والنشاط، وبعد موت السمك يشكل أهم المكونات في السمك كغذاء للإنسان لقيمته الغذائية وخصائصه الوظيفية . ويتراوح محتوى عضلات السمك من البروتين ما بين ١٥-٢٠ ٪ في السمك اللحمي شحيح الدهن Lean ، ويتباين محتواه بين الأنواع وداخل النوع .

ويحتوي بروتين السمك في المتوسط ١٦ ٪ نيتروچين ، ويتم تقديره بنفس الطريقة التي وضعها العالم الهولندي Kjledahl سنة ١٨٨٣ والتي طورت عدة مرات لكن على نفس الأساس ، أي هضم المادة العضوية بحامض قوي حتى يتحول كل النيتروچين إلى كبريتات أمونيوم ، وتتحرر الأمونيا بإضافة الصودا الكاوية والتي تقطر على حامض بوريك أو حامض قياسي لمعايرتها . والبروتين الكلي يتضمن البروتين الحقيقي وغير الحقيقي (ثالث ميثيل أوكسيد الأمين، يوريات تورين، ببتيدات ، أحماض أمينية، نيوكلوتيدات ، ومركبات أساسها البيورين) .

ويشكل النيتروچين غير البروتيني في السمك مجموعة من المركبات المسؤولة غالباً عن

طعم السمك ، وهي مركبات غير بروتينية وإن احتوت على النيتروچين ، إذ لا تترسب في حمض ثلاثي كلورو الخليك (١٠ ٪) ، وتشكل ٠,٥-١ ٪ من وزن عضلات السمك .

ويقدر بترسيب البروتين بالخلط مع حمض ثلاثي كلورو الخليك (١:٢) ، ويحلل النيتروچين في المستخلص (حمض ثلاثي كلورو الخليك) بطريقة الميكرو كلداهل ، وإذا حفظت العينة أو مستخلصها لحين التقدير فيكون ذلك بالتجميد (-٢٠ْم) .

٧ ـ بروتين اللبن :

ورغم تقدير البروتين في اللبن بطريقة الماكرو كلداهل ، إلا أنه يستخدم في اللبن كذلك طريقة سريعة لتقدير بروتين اللبن الطازج ، وهي طريقة الفورمول Formol : يضاف ٠,٥ مل دليل فينول فثالين (٠,٥ ٪) + ٠,٤ مل أوكسالات بوتاسيوم مشبعة متعادلة إلى ١٠ مل لبنا ، وتترك تستقر عدة دقائق بسيطة ،ثم عادل بالصودا الكاوية ٠,١ عياري حتى يظهر لون طوبي ، أضف ٢ مل فورمالين إلى ما سبق ، واتركه دقائق قليلة ، ثم نقط الحموضة الجديدة الناتجة بالصودا الكاوية ٠,١ عياري إلى ظهور لون طوبي . نقط منفصلاً ٢ مل فورمالين + ١٠ مل ماء بواسطة ٠,١ عياري صودا كاوية كمقارنة . وعليه فالمحتوى البروتيني في اللبن ٪ (والمكافئ للأزوت × ٦,٣٨) عبارة عن ١,٧ × (كمية قلوي العينة - كمية قلوي المقارنة) .

ونظراً إلى أنه لم يعد بعد تقييم اللبن على أساس الدهن فقط بل ينظر إلى الدهن والبروتين معاً ، فيقدر البروتين بطريقة كلداهل أو الفرمول . كما يقدر الكازين بوزن ٥ جم لبن في كأس ١٠٠ مل مع إضافة ٥٠ مل ماء دافئاً (٤٠ْم) + ٠,٥ مل حمض خليك (١٠ ٪) وبعد ١٠ دقائق يضاف ٠,٥ مل محلول خلات صوديوم عيارية ، واخلط ثم برد ورشح ، واغسل الراسب ٣ مرات على ورقة الترشيح ، ثم اهضم ورقة الترشيح بالراسب لتقدير الأزوت (أزوت الكازين) بطريقة كلداهل .

٨ ـ التقييم للمركبات النيتروچينية في الأغذية :

تشكل البروتينات أهم المجاميع الغذائية الأساسية كميا . نقص أي حمض أميني يحدد من تخليق البروتين في الجسم ، كما تضر الزيادة في واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية (عدم اتزام الأحماض الأمينية) ، فليس المهم فقط كم البروتين بل محتواه من الأحماض الأمينية . ويتم تقييم البروتين على أساس ميزان الأزوت ، أو تحليل الأحماض الأمينية ، أو نسبة كفاءة البروتين ، أو نسبة البروتين الصافي ، أي عن طريق تجارب على الحيوان (لمعرفة التأثير المتجمع أو الشامل لبروتين علف ما وهذا يتطلب كثير من العمل والمواد الغذائية، كما يجرى على عدد محدود من العينات الغذائية) ؛ أو بتقدير البروتين الحقيقي، أو البروتين الخام وإن كانا لا يعطيان فكرة عن ما يمكن الاستفادة به من الأحماض الأمينية

التي قد تتعرض للتغيرات نتيجة المعاملات المختلفة كالتجفيف بالتسخين أو طول التخزين فتتحول إلى مركبات غير مهضومة ولو جزئياً لارتباطها بالمجاميع الجانبية على البروتين أو بمجاميع الألدهيد للسكر (اشتباك وتقاطع جزئيات البروتين، Fructoselysin) . ومن اختبارات تقييم المركبات النيتروجينية ما يلي :

أ ــ الليسين :

بإنتاج وتخزين المواد الغذائية وفي وجود السكريات المختزلة والكربوهيدرات فإنه تتراكم نواتج تفاعلات Maillard ، والتي فيها تتداخل أولاً مجاميع الألفا أمين الحرة لليسين ، وعلى درجات الحرارة الأعلى تتواجد ارتباطات في الجزيئات لها مقاومة إنزيمية ناتجة من مجاميع الأمين الحرة ومجاميع الهيدروكسيل مع مجاميع الكربوكسيل والمجاميع الجانبية على شريط البروتين ، وهذا تفاعل لا يشترط وجود الكربوهيدات وعلاوة على ذلك يلاحظ تكاثف الأحماض الأمينية الحرة مع نواتج هدم الأحماض الدهنية المؤكسدة أثناء التخزين . وعلى ذلك فتقدير الليسين الكلي كيماوياً لا يعطي الضوء على مثل هذه الأضرار بالبروتين. إلا أنه يمكن تقدير الليسين الممكن الاستفادة به عن طريق قابلية تفاعل مجاميع الألفا أمين التي مازالت موجودة لليسين مع dinitrofluorbenzol .

ب ــ اختبار اليورياز (امتصاص أحمر الكريزول) :

يمكن تقدير الأحماض الأمينية الموجودة في مواد غذائية بطريق غير مباشر ، كما في مخلفات فول الصويا واستخدام اختبار اليورياز على سبيل المثال . فالصويا الخام يحتوي مثبطاً إنزيمياً (Enzyme Inhibitor (Trypsin Inhibitor يتأثر بالحرارة ، ووجوده يخفض من القيمة الحيوية للبروتين ، ويخفض من معاملات الهضم ، لذا تعرض مخلفات الفول الصويا للتحميص بالتسخين بالبخار ، ويكشف عن تمام هذه العملية بتقدير نشاط إنزيم اليورياز الذي يتأثر بالحرارة وهو موجود بالصويا أساساً ، وهو قادر على تحرير ٣-٥ مجم نيتروجين/جم من محلول يوريا على ٣٠°م لكل دقيقة ، وينخفض هذا المعدل إلى ٠,٥ مجم أزوت/جم بعد التحميص .

وترتفع مقدرة بروتين الصويا على الارتباط بمجاميع الفثالين في مادة ملونة بارتفاع حرارة التحميص ، ووجد أن القدر الأمثل لوجود البروتين كان عند امتصاص ٤,٥ - ٦,٦ مجم أحمر كريزول / جم مخلفات صويا .

وعلى ذلك وجد أنه لتقييم البروتين قد يحلل البروتين الخام الكلي ، والبروتين الحقيقي والبروتين الذائب أو الأزوت غير البروتيني ، والبروتين الخام المهضوم معملياً ، وتقدير الليسين الممكن الاستفادة منه ، ومقدرة الاستفادة من بروتين الصويا باختبار اليورياز ، لكن ليس هذا كل ما يمكن إجراؤه لتقييم بروتين مادة غذائية بل قد نضطر إلى تحليل مكونات

أزوتية أخرى لأهميتها في عائلات نباتية معينة أو لارتباطها بنظام زراعي معين مرتبط بالتسميد أو التربة أو غزارة النباتات أو خلافه من العوامل الأخرى البيئية ، ومن هذه الاختبارات :

جـ ـ الأمونيا فى المستخلصات المائية للمواد الغذائية :

ومن أبسط طرق تقديرها هي استخدام وحدات Conway المكونة من طبقين بتري داخل بعض تامي الالتصاق ، قطر الخارجي ١٠,٥سم والداخلي ٦,٥سم ، والغطاء مفرد بقطر ١٢سم . وفيه تدهن طبقة كثيفة من الفازلين قرب حواف الغطاء ، وطبقة رقيقة جداً على قمة جدار الحجرة الداخلية ، وذلك لمنع أي من المحلولين داخل وخارج الغرفة الداخلية من الامتزاج . تسند الأطباق كلها على شيء يجعلها مائلة إلى أحد الجوانب ميلاً خفيفاً ، ثم يوضع في الحجرة الخارجية ١ مل كربونات بوتاسيوم مشبعة مع مراعاة صب هذه الكمية عند أسفل ميل للطبق ، ثم يوضع في الحجرة الداخلية ٢ مل محلولا منظماً (دليل حمض بوريك مع دليلي أحمر الميثيل والبروموكريزول جرين) ، ثم يوضع الغطاء ذو الفازلين على الطبق ، مع مراعاة ترك مسافة صغيرة مفتوحة عند أعلى ميل للطبق ليصب منها ٠,٥ مل عينة مقاسة بالضبط ، ثم يحكم الغطاء على الطبق كله ويعدل الطبق ، مع لفه بخفة مرتين أو ثلاثة ، لضمان امتزاج الكربونات بالعينة ليبدأ انطلاق الأمونيا التي يمتصها المنظم فيتغير لونه . يترك الطبق مع وضع ثقل خفيف عليه لإحكام قفله ٦ ساعات. ارفع الغطاء بحذر ونقط المنظم في الحجرة الداخلية بحمض كبريتيك ٠,٠١ عياري حتى التعادل . كمية الأزوت في صورة أمونيا جم = عدد ملليلترات الحامض × عياريته × ٠,٠١٤ وقد صممت وحدات أخرى سميت بجهاز Van Slyke ، حلت الأنابيب بدلا من الأطباق ، واستخدم فيها نفس المحاليل إلا أنها قد تتطلب مجهوداً أكبر من الطريقة السابقة.

كما قد يقدر الأزوت الأمونيومي كذلك في العينة الصلبة بتقطيرها (٢جم) مع هيدروكسيد كالسيوم (٢جم مسحوق خالي الكربونات) والماء المقطر (٣٠مل) في دورق على حمام مائي (٤٠-٥٠°م) ، على أن يتصل بالدورق تيار هواء خالي الرطوبة والأمونيا (مار على حمض H_2SO_4 ١٠٪) ومتصل كذلك بمكثف ليبج منهي بدورق استقبال به دليل حمض البوريك ، ويستقبل المتقطر لمدة ساعة ، ويعادل بحمض ٠,٠١ عياري بنفس الطريقة .

د ـ الأمونيا والقواعد الأزوتية الطيارة (عياريًا):

١ ـ زن حوالي ٥جم بالضبط من العينة ، وانقلها إلى دورق مدرج سعة ٢٥٠ مل .

٢ ـ أضف ماء إلى العلامة ، ورج الدورق بمحتوياته ١٠ دقائق لإذابة الأملاح القابلة

للذوبان .

٣ ـ رشح واجمع الراشح في دورق نظيف ، وانقل منه حجماً معلوماً بماصة إلى دورق جاف . ثم أضف ٥٠ مل حمض كبريتيك (٠,١ عياري) في دورق مخروطي مع نقط من دليل أحمر ميثيل (٠,٢ جم أحمر ميثيل في ١٠٠ مل كحول إيثيل ٩٥-٩٦٪ ، ٠,١ جم أزرق ميثيلين في ١٠٠ مل إيثانول ٩٥-٩٦٪ واخلط الحجمين معاً) وكمية من الماء ليرتفع سطح المحلول عن فتحة الساق الزجاجية التي سينزل منها الأمونيا (من الدورق الذي به الراشح بعد إمرار الهواء) .

٤ ـ أكمل الحجم المأخوذ من راشح المستخلص للعينة إلى ٥٠ مل بالماء ، وأضف إليه نقطتين من الأوكتانول لمنع الفوران ، ثم أضف ٥٠ مل محلول كربونات بوتاسيوم مشبعة ، وسد بسرعة لمنع تسرب الأمونيا .

٥ ـ مرر تياراً هوائياً بمعدل ٣لتر / دقيقة على أن ينقى الهواء بتمريره خلال دوارق غسيل تحتوي حمض كبريتيك مخففاً وهيدروكسيد صوديوم مخففاً .

٦ ـ يجب تحرير الأمونيا كاملاً خلال ٣ ساعات ، فك الدورق المخروطي ، واغسل الساق الزجاجية بماء . عاير الزيادة من الحامض بهيدروكسيد صوديوم ٠,١ عياري .

٧ ـ أجر عمل تجربة خاوية بنفس الخطوات دون إضافة عينة ، واحسب أزوت الأمونيا كنسبة مئوية من العينة = (حجم القلوي المستخدم في معايرة التجربة الخاوية – حجم القلوي المستخدم في معايرة العينة) × ٠,١٤ / وزن مستخلص العينة بالجرام الموجود في الجزء المأخوذ للتحليل .

هـ ـ اليوريا :

اليوريا في مواد العلف المركزة من الأهمية لما يضاف إليها من يوريا لإغنائها في البروتين الخام كغش تجاري لرخص اليوريا وغناها في الأزوت (٤٢٪) ، إلا أنها تفيد الحيوانات المجترة لكن زيادتها تؤدي إلى تسمم إذا استهلك منها كمية كبيرة دفعة واحدة في التغذية؛ لذا يعمل مستخلص مائي للعينة ثم يقدر في جزء منه كمية الأمونيا بالطريقة السابقة . خذ جزءاً آخر من المستخلص + ٤ أمثال حجمه من محلول إنزيم منشط [٠,٢٥ جم مستخلص فول صويا + ٢٥ مل ماء مقطراً في حضان على ٤٠°م لمدة ٢٠ دقيقة لتنشيط الإنزيم فيسمى بمستخلص فول الصويا Jackbeans ، لكن في تقدير يوريا الدم أو الكبد فيلزم إنزيم يوريا نقي ؛ لأن الدم والكبد يحتويان أرجيناز يؤثر على أرجنين الصويا ويحوله إلى يوريا فيكون التقدير زائداً عن الواقع ؛ لذا يستخدم مستخلص فول الصويا كمصدر لليورياز عند تقدير يوريا مواد العلف أو عصير الكرش أو السيرم لخلوها من الأرجيناز] . تترك العينة واليورياز لمدة ٦ ساعات على حرارة الغرفة ، ثم تضاف كربونات بوتاسيوم مشبعة

وتتبع باقي خطوات تقدير الأمونيا . تطرح كمية أزوت الأمونيا المقدرة في أول الطريقة من المقدرة بعد التحلل الإنزيمي ، والفرق يمثل الأمونيا التي مصدرها اليوريا المنطلقة بفعل الإنزيم .

تقدير اليوريا ضوئياً :

١ ـ يوزن عينة بالضبط حوالي ٢ جم (تحتوي ٥٠-٢٠٠مجم يوريا) ، وتوضع في دورق مدرج ، ثم يضاف ١٥٠ مل حمض هيدروكلوريك (٠,٠٢ عياري) ، ويرج ٣٠ دقيقة ثم يضاف ١٥ مل محلول خلات صوديوم (١٣٦ جم خلات صوديوم ثلاثي الماء/ لتر ماء) ، اخلط ثم أضف ١ جم فحماً نشطاً ، ثم رج واترك الدورق لمدة ١٥ دقيقة . أضف ٥ مل محلول كاريز رقم ١ Carrez Solution (أذب ٢١,٩ جم خلات زنك ثنائي الماء في ماء ، ثم أضف ٣ مل حمض خليك ثلجي ، وخفف إلى ١٠٠ مل بالماء) يليها ٥ مل محلول كاريز رقم ٢ (١٠,٦ جم حديد وسيانيد بوتاسيوم / ١٠٠ مل) ، واخلط بين كل إضافة وأخرى . خفف إلى حجم معلوم بالماء ، واخلط ثم رشح جزءاً من المحلول إلى كأس نظيف سعة ٢٥٠ مل .

٢ ـ انقل ١٠ مل من الراشح إلى أنبوبة اختبار ذات سدادة ثم أضف إليها ١٠ مل محلول التلوين (أذب ١,٦ جم ٤- دي ميثيل أمينو بنزالدهيد في ١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٦٪ ، ثم أضف إليها ١٠ مل حامض هيدروكلوريك كثافة ١,١٨ جم / مل) .اخلط ثم اتركه ١٥ دقيقة ، وقس الامتصاص الضوئي على ٤٣٥ نانومتر ضد عينة خاوية من نفس محاليل التحضير لكن بدون عينة [١٠ مل محلول تلوين + ١٠ مل ماء] .

٣ ـ خفف ٥ ، ١٠ ، ٢٠ ، ٣٠، ٤٠ مل محلول يوريا (٠,١ جم يوريا / ١٠٠ مل) إلى ١٠٠ مل بالماء ، وانقل من كل منها ١٠ مل إلى أنبوبة اختبار ذات سدادة ، ثم أضف ١٠ مل محلول تلوين ، واخلط واتركها ١٥ دقيقة ، ثم قس الامتصاص على طول موجة ٤٣٥ نانومتر ضد نفس العينة الخاوية Blank ، ووقع منحنى العلاقة بين الامتصاص وكميات اليوريا التي تحتويها أنابيب المحلول القياسي لليوريا .

٤ ـ قدر كمية اليوريا في العينات باستخدام المنحنى القياسي السابق رسمه في الخطوة السابقة، وعبر عن النتيجة كنسبة مئوية من العينة (٪ يوريا × ٠,٤٦٦٥ = ٪ أزوت يوريا) .

ولتقدير اليوريا في مواد العلف بطريقة المونوكسيم تجرى الخطوات التالية :

١ ـ يوزن ١ جم عينة بالضبط (علف مخلوط ، أعلاف خشنة ، سيلاج) في دورق معياري ١٠٠ مل ، ويضاف عليها حوالي ٧٥ مل ماء مقطراً . يستخلص بالرج لمدة ٠,٥ ساعة ، ثم يستكمل إلى العلامة ويخلط .

٢ ـ يؤخذ من الدورق ٢٠ ميكرولتر ، وتنقل إلى أنبوبة صغيرة ١,٥ مل بها ١ مل حمض بيركلوريك (١٢ مل حمض بيركلوريك مركز تستكمل بالماء حتى ٢٥٠ مل) ، وتسد الأنبوبة وتخلط جيداً ثم تطرد مركزياً . اسحب ٢٠٠ ميكروليتر من الرائق إلى أنبوبة أخرى ٧ مل ويضاف إليها ٢٠٠ ميكروليتر دي أسيتل مونوكسيم (١ جم دي أسيتيل مونوكسيم أو دي أسيتيل دي أوكسيم في ٩١ مل إيثانول مطلق + ٢٣ مل ماء مقطراً . احفظ في ثلاجة ، يظل صالحاً بالشهور) + ١ مل دليل (٠,٥ جم ١- فينيل - ٢-٣- دي ميثيل بيرازولون + ٠,٤٥ جم كبريتات حديديك أمونيوم (٢٤ جزء ماء) في ٦٠ مل ماء مقطراً + ١٥ مل حمض كبريتيك مركزاً ويكمل بالماء إلى ١٠٠ مل . يظل ثابتاً لشهور بحفظه في ثلاجة) . اخلط لمدة ٣٠ دقيقة على ٩٥°م على سخان .

٣ ـ تجرى خطوة رقم (٢) على محلول قياسي (٢٠ ميكروليتر محلول ٤٠ مجم يوريا/ ١٠٠ مل) وعلى مقارنة (٢٠ ميكروليتر ماء مقطراً) .

٤ ـ بعد التبريد تحت تيار ماء بارد يتم قياس الكثافة الضوئية على ٤٧٠ نانومتر .

٥ ـ لحساب تركيز اليوريا في العينة (جم/كجم) = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٤٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$

و ـ النترات :

والنترات هام جداً في بعض المراعي ومواد العلف نتيجة التلوث من المصانع ، وزيادة وعدم تجانس التسميد الأزوتي ، ولظروف التربة وغيرها من إضافات ومصادر التلوث . ومن أبسط طرق تقدير الأزوت النتراتي طريقة شبيهة بطريقة تقدير الأزوت الكلي مع استبعاد مخلوط الهضم. فيؤخذ ٥ مل بالماصة من المحلول المائي للعينة في دورق كلداهل ٥٠ مل+ ٠,٣ جم حديد مختزل + ٣ مل حمض كبريتيك مركزاً . اهضمها على لهب لمدة ٥ دقائق ثم بردها . انقلها كمياً لجهاز التقطير ، واستقبل الأمونيا في حمض بوريك ٤٪ وعادل كما سبق . تعمل عينة خالية ، وتضاف نقطة زيت برافين للتحكم في الفوران ، وتعمل التقديرات مزدوجة .

وهناك طريقة أخرى لونية تعتمد على دليل Phenol disulphonic acid الذي تعامل به المستخلصات النباتية بمحلول مورجان Morgan' وقياس اللون كهروضوئياً على ٤٣٥-٤٨٠ نانومتر ومضاهاة القراءة على منحنى قياسي لمعرفة التركيزات .

تقدير الأزوت النتراتي :

١ ـ يجهز مستخلص عينة بأخذ ٣ جم عينة في كأس ١٠٠ مل مع ٣٠ مل محلول مورجان + ٠,٥ جم فحماً نشطاً ، وتترك ١٥ دقيقة مع التقليب بمحرك مغناطيسي . رشح وانقل الراشح إلى دورق معياري ١٠٠ مل ، وأكمل إلى العلامة بالماء .

٢ ـ يحضر محلول قياسي بإذابة ٣,٦٠٨٥ جم نترات بوتاسيوم في لتر ماء مقطر ، ويؤخذ منه ٢ مل في دورق معياري ١٠٠ مل + ٣٠ مل محلول مورجان ، ويكمل إلى العلامة بالماء فيكون كل ١ مل منه محتوياً على ١٠ ميكرو جرام أزوت نتراتي أي ١٠ جزء في المليون .

٣ ـ يحضر مقارنة من ٣٠ مل محلول مورجان + ٧٠ مل ماء مقطراً .

٤ ـ يؤخذ من كل من مستخلص العينة ، محلول قياسي ، مقارنة ٥ مل في كؤوس منفصلة ، ويضاف إلى كل منها ٢ مل حامض فينول دي سلفونيك ، واتركها ١٥ دقيقة . يضاف بعدها إلى كل كأس ٥ مل ماء مع الرج الخفيف والتبريد تحت مياه صنبور ، ثم يضاف ١٠ مل أمونيا مع الرج الخفيف والتبريد تحت مياه صنبور . أضف ٣ مل ماء ليصير مجموع حجوم السوائل في كل كأس ٢٥ مل . اخلط جيداً وبعد أن تبرد المحاليل تقدر كثافتها الضوئية باستخدام مرشح أزرق ٤٣٥–٤٨٠ نانومتر .

ز ـ النيتريت Nitrite :

١ ـ زن ٥ جم عينة مطحونة (أو مفرومة) في كأس ٥٠ مل ، ثم أضف ٤٠ مل ماء مقطراً في درجة الغليان ، وقلب بساق زجاجية .

٢ ـ انقل إلى دورق معياري ٥٠٠ مل بالغسيل بماء مقطر ساخن (٢٠٠ مل) ، مع العناية بتمام نقل العينة كمياً ، واتركه ٥ ساعات على ٢٠°م .

٣ ـ أضف ٥ مل محلول كلوريد زئبقيق مشبع ، اخلط وأكمل إلى العلامة بالماء المقطر . ثم رشح .

٤ ـ استقبل حجماً معيناً من الراشح في دورق معياري ٥٠ مل ، ثم أضف إليه ٢ مل حمض سلفانيليك الفانافثيل أمين (محلول يحضر بإذابة ٠,٥ جم حمض سلفانيليك Sul-phanilic في ١٥٠ مل حمض خليك ثلجي ١٥٪ ، ويضاف إلى هذا المحلول ٠,١٢٥ جم الفانافثيل أمين naphthylamine – في ٢٠ مل ماء مقطراً يغلي ويخزن في مكان مظلم.

٥ ـ خفف إلى العلامة ، اتركه يستقر ساعة بالضبط ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٥٢٠ نانومتر ضد مقارنة من ماء مقطر .

٦ ـ قدر كذلك الكثافة الضوئية لمحلول قياسي من النيتريت (أفضلها ما حضر من نيتريت فضة في محلول كلوريد صوديوم) معامل بالخطوتين (٤،٥) .

وهذا الاختبار هام لمواد العلف الملوثة بالنيتريت ، إما لزيادة تسميدها الأزوتي ، أو لزراعتها في أرض مطبلة غدقة ، أو زراعتها كثيفة ، أو لريها من مياه آبار ، أو لزراعتها بالقرب من مصانع أسمدة كاليوريا . كذلك يقدر في الأنسجة البيولوجية من دم ولبن

وسائل كرش كمؤشرات لحالة تسمم نيتريتي ، ربما للتغذية على أعلاف غنية بالنيترات / نيتريت أو اليوريا ، أو لشرب مياه آبار .

ح ـ النيتروچين الأميني :

يقدر في مستخلص مائي للعينة بعد الترشيح ، فيؤخذ ٢٥ مل محلول عينة +٢ مل محلول فورمالدهيد متعادل (فورمالدهيد ٣٧٪ يعادل بالقلوي المستعمل في التقدير في وجود الفينولفثالين حتى اللون الأحمر الباهت) ، ويرج جيداً ثم يضاف ١ مل فينولفثالين ويجرى التعادل بالصودا الكاوية المخففة ٠,٠١ عياري حتى اللون الوردي الخفيف الثابت لمدة دقيقة. ويكون عدد ملليجرامات النيترچين الأميني في ١٠٠ جم عينة = حجم القلوي× عياريته × ١٤ × حجم العينة (المستخلص الكلي) × ١٠٠ / وزن العينة × ٢٥.

وهناك طرق أخرى لتقدير الأزوت الأميني كطريقة ڤان سلايك ، أو طريقة معلق النحاس ، لكن هذه أبسطها .

تقدير الأحماض الأمينية كروماتوجرافيا :

يتم التقدير كمياً بعد الاستخلاص والفصل على الكروماتوجرافي الورقي ، ثم الاستخلاص من الورق لتقديره لونياً بالمقارنة بمحلول قياسي على منحنى قياسي .

١ ـ زن ٢-١٠ جم بالضبط من النسيج حسب محتواه البروتيني والمائي .

٢ ـ تستخلص إما بالحامض acid hydrolysis (بالتسخين مع HCl تركيز ٦ عياري تحت مكثف عاكس على١٠٥°م لمدة ٢٢ ساعة ، ثم التبخير والغسيل بالماء لإزالة أثر الحامض) (وفيها تهدم الأحماض الأمينية كالتيروسين والتربتوفان) ، أو بالقلوي Alkaline Hydrolysis (بالتسخين مع محلول مشبع من أيدروكسيد الباريوم على ١٠٥°م لمدة ساعتين ثم المعادلة بالكبريتيك العياري والغسيل بالماء) ، أو قد تستخلص بكحول الإيثايل ٩٥٪ (١٥-٢٠ مل) بالغليان على حمام مائي ١٠ دقائق .

٣ ـ رشح باستخدام الصوف الزجاجي ، واستقبل الراشح في دورق معياري ٢٥٠ مل ، وأكمل للعلامة بنفس الكحول .

٤ ـ خذ حجماً معلوماً بماصة ميكرومترية (٠,٠١ مل) ، وضعها على خط الابتداء على شكل دائرة لايزيد قطرها عن ٠,٥ سم . توضع العينات في مكررتين بجانب بعضهما على مسافة ٥-٧سم من ورق Whatman No. 1 بمساحة ٤٥×٤٠سم (أو شرائط) حيث خط الابتداء على مسافة ٢,٥ سم من حافة الورق ، وتحاط العينة بالتحديد بقلم رصاص مناسب مع عدم الخروج بالعينة عن حدود الدائرة ، وألا تمس العينة محلول التطوير .

٥ ـ ضع كأسا به ماء في أحد جوانب إناء التطوير لتشبيع جو الإناء بالماء قبل وضع الكروماتوجرام فيه .

٦ ـ تجفف نقطة العينة ، وتطوى ورقةالترشيح لتكون إسطوانة (بحياكة حافتي الورقة) وتوضع قائمة في الإناء الزجاجي (عادة مجفف عادي) ، أو تعلق الورقة في الإناء مستخدماً الطريقة الصاعدة (وقد تستخدم الطريقة الهابطة لجودة الفصل ، أو الطريقة ثنائية الاتجاه Two dimensional) . جهز ورقاً آخر بمحلول الأحماض الأمينية كل حمض أميني على حدة . يحتوي إناء التطوير على المذيب (كحول بيوتايل ن / حمض خليك ـ ماء بنسبة ٥/٣/١٢ إذا كان التطوير في اتجاه واحد ، أو ماء / بيوتانول / حمض خليك بنسب ١/٤/٥ بخلطها في قمع فصل وتركها ٢٤ ساعة مع تكرار الرج على فترات ، ثم سحب الطبقة السطحية وترشيحها لامتصاص باقي الماء وذلك كمذيب للاتجاه الأول ، وكمذيب للاتجاه الثاني يستخدم الفينول المشبع بالماء (٨٠٪) مع الأمونيا (٠,٣٪) حتى يصير قلويا) .

٧ ـ يتم التطوير لمدة ١٢ ـ ٢٢ ساعة (أو لمسافة ١٥ سم في اتجاه أول ، وتفك الحياكة، وتحاك في اتجاه عمودي ، وتطور بعد الجفاف في الاتجاه الثاني لنفس المسافة) ، وتجفف في الهواء لمدة ساعة ، ويعاد تعليقها لمدة ١٢ ـ ٢٢ ساعة أخرى في نفس المذيب والاتجاه ، وتجفف الكروماتوجرام بمروحة كهربية ، أو مجفف شعر ، أو على حرارة الغرفة ، ثم ترش أو تغمس في محلول إظهار (ننهيدرين ٠,٢٪ في أسيتون أو بيوتانول / أسيتون (١/١) أو بيوتانول / حمض خليك (٩٥٪) كمحلول للغمس ، أو ٠,٥٪ في كحول إيثايل للرش) .

٨ ـ تترك الورقة لتجف في الجو العادي ، أو على ٦٠ـ١٠٥°م لمدة ١٠ـ١٥ دقائق ، فتظهر نقط بنفسجية اللون ، كل واحدة منها تمثل حمض أميني .

٩ ـ يعلم بالقلم الرصاص حول البقع لتحديد قيمته R_F لكل نقطة ، لتقارن بالـ R_F للأحماض الأمينية القياسية المعروفة ، والمعاملة على نفس الكروماتوجرام ، وذلك لتمييز بقع العينة ، وتحديد نوع أحماضها الأمينية ، وهناك خرائط وجداول موضوعة للأحماض الأمينية القياسية ، تبين قيم RF لها في مختلف المذيبات .

١٠ـ تقطع البقع الخاصة بكل حمض أميني على حدة ، قطعاً صغيرة جداً ، وتوضع في أنبوبة اختبار ، وكذلك يفعل نفس الشيء لبقع المحاليل القياسية ، في أنابيب أخرى . ضع في كل أنبوبة ١٠ مل من كحول الإيثايل ٥٠٪ ، وترج بشدة لمدة ١٠ دقائق ، ورشح خلال صوف زجاجي إلى دورق معياري ٢٥ مل ، مع تكرار الاستخلاص ٣ مرات ، في كل مرة ٥ مل أخرى مع الرج ، واجمعها في الدورق المعياري ، وأكمل بنفس الكحول

للعلامة .

١١- قدر الكثافة الضوئية لكل أنبوبة على طول موجة ٥٦٠ نانومتر ، ماعدا الحمض الأميني برولين ، هيدروكسي برولين ، فتستخدم طول موجة ٤٤٠ نانومتر ، وبمقارنة O.D. للمحلول المجهول بمثيلتها للمحلول القياسي ، يمكن حساب كمية الحمض الأميني في العينة بالملليجرام / ١٠٠ جم عينة = قراءة المحلول للعينة × تركيز الحمض الأميني القياسي (جزء / مليون أو ميكروجرام / جرام) / قراءة المحلول القياسي × ١٠ × وزن العينة جم .

١٢- قد يعمل محلول قياسي من كل حمض أميني بتركيزات مختلفة ، وتتم عليه الخطوات (٥-١٠) وتقرأ الكثافة الضوئية ، ويرسم منحنى قياسي للعلاقة بين تركيز الحمض بالجزء في المليون وقراءة الجهاز ، ثم يتعرف على تركيز العينة باستخدام المنحنى القياسي حيث تركيز الحمض الأميني بالعينة مجم / ١٠٠ جم =

$$\frac{\text{القراءة بالجزء في المليون}}{١٠٠٠} \times \text{التخفيف} \times \frac{١٠٠}{\text{وزن العينة جم}}$$

ملاحظات :

١ - هذه أبسط طريقة لتقدير الأحماض الأمينية ،وهي أكثر الطرق استعمالا وانتشاراً ، وذات دقة مقبولة لو تم الفصل التام لكل حمض أميني على حدة .

٢ - يستخدم قلم رصاص جاف ، لتحديد مناطق البقع وخطي البداية والنهاية والتخطيط لشرائح لكل نقطة .

٣ - يجرى الرش أو الغمس في خزانة زجاجية ، مع عدم الإفراط في الرش حتى لا تنزل نقطة المحلول من أسفل الكروماترجرام .

٤ - إذا استخلص الحمض الأميني (أي العينة) بكحول الإيثايل في دورق معياري ٢٥ مل ، وأخذ منه ٠٥, مل على الكروماتوجرام أي أن التخفيف = $\frac{٢٥}{٠٥,}$ = ٥٠٠ مرة .

٥ - محلول الإظهار بالرش (٠,٢ - ٠,٥٪ من النينهيدرين في كحول إيثايل ، أو ماء مشبع بالبيوتانول) أو بالغمس (٠,٢ - ٠,٥٪ ننهيدرين في أسيتون) .

٦ - قدرت R_F للأحماض الأمينية (عند استخدام مذيب مكون من حجم بيوتانول مع حجم ماء والخلط جيداً ، ثم يؤخذ منها ٥٠٠ مل يضاف إليها ٦٠ مل حمض خليك ثلجي ، وتهمل الطبقة السفلى للمخلوط) فوجدت كالتالي :

Alanine	0.62	Arginine	0.53
Aspartic Acid	0.25	Glutamic acid	0.39
Glycine	0.49	Histidine	0.81

Isoleucine	0.85	Lysine	0.41
Methionine	0.74	Phenylalanine	0.87
Proline	0.87	Serine	0.33
Threonine	0.57	Tryptophan	0.81
Tyrosine	0.51	Valine	0.82

٧ ـ استخدمت أعمدة الكروماتوجرافي Columns لفصل الأحماض الأمينية ، إلا أنها تحتاج لغسيل بكميات كبيرة من الحامض ، وتحتاج محاليل منظمة عديدة ، كما تحتاج هذه الطريقة وقتاً طويلاً ٤-٥ أيام ، إلا أنها طورت حديثاً لاختصار الوقت .

٨ ـ استخدم TLC ، GC لتفريد الأحماض الأمينية وقياسها كمياً ، إلا أن الجهاز المتخصص في تقديرها هو Amino Acid Analyser ، والذي يغذي بمحاليل منظمة مختلفة درجة الحموضة PH لتناسب فصل الأحماض المختلفة ، وقد تطور كثيراً هذا الجهاز ، ووصل من الدقة والبرمجة للحد الكبير ، ويمدنا بكروماتوجرامات عليها منحنيات للأحماض الأمينية المختلفة ومعها كذلك تركيز كل حمض مطلق ونسبي .

٩ ـ المركبات النيتروچينية ذات الأهمية الفسيولوچية :

أ ـ الهيموجلوبين (طريقة بيرسلفيت) :

يحتوي الهيموجلوبين على ٠,٣٤٪ حديداً ، وقد وجد أن ٩٨-٩٩٪ من حديد الدم يوجد في الهيموجلوبين . ويقدر الهيموجلوبين عن طريق تقدير الحديد كالتالي :

١ ـ ينقل ٠,٥ مل دم مخلوط بالأكسالات مع ٢ مل حمض كبريتيك نقي خال من الحديد مع الرج ١-٢ دقيقة . أضف ٢ مل محلولاً مشبعاً من بوتاسيوم بيرسلفيت ثم اخلط جيداً . أضف ٢٥ مل ماء مقطراً + ٢ مل محلولا ١٠٪ من تنجستات صوديوم ، ورج ثم برد إلى حرارة الغرفة ، وأكمل في دورق معياري إلى علامة ٥٠ مل بالماء المقطر . رشح واجمع الراشح .

٢ ـ أضف ٢٥ مل ماء مقطراً في دورق معياري ٥٠ مل ، ثم أضف ٢ مل حمض كبريتيك مركزاً + ٢ مل محلول مشبع بوتاسيوم بيرسلفيت + ٢,٥ مل محلول حديد قياسي يحتوي كل ١ مل منه على ٠,١ ملجم حديداً ، ثم برد على درجة حرارة الغرفة ، وأكمل إلى العلامة بالماء .

٣ ـ في دورق معياري ٥٠ مل ضع ٢ مل حمض كبريتيك مركزاً + ٢ مل محلولاً مشبعاً من بوتاسيوم بيرسلفيت ، وأكمل بالماء إلى العلامة كمقارنة لضبط الجهاز عليها .

٤ ـ يؤخذ ١٠ مل من الراشح الناتج من العينة (أو من المحلول القياسي للحديد ، أو من

المقارنة ، خطوة رقم ٣) في أنبوبة سعة ٢٥ مل + ٠,٥ مل محلولاً مشبعاً من بوتاسيوم بيرسلفيت + ٢ مل محلول بوتاسيوم ثيوسيانات واخلط جيداً ثم اقرأ الكثافة الضوئية في ظرف ٣٠ دقيقة على طول موجة ٤٨٠ نانومتر ، واحسب تركيز الهيموجلوبين جم / ١٠٠ مل دم = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٠,٢٥ \times ١٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times ٠,٥ \times ٣,٤}$

تحضير المحاليل :

١ ـ بوتاسيوم بيرسلفيت مشبعة : أذب ٧٠ - ٨٠ جم بوتاسيوم بيرسلفيت خالية الحديد في لتر ماء مقطر .

٢ ـ تنجستات صوديوم ١٠٪ : أذب ١٠٠ جم تنجستات صوديوم نقية في لتر ماء .

٣ ـ محلول حديد قياسي : أذب ٠,٧٠٢ جم من كبريتات أمونيوم حديدوز في ١٠ مل ماء + ٥ مل حمض كبريتيك مركزاً ، وسخن ببطء ثم أضف نقطة برمنجنات بوتاسيوم مشبعة ، لتكوين لون قرمزي ثابت ، وينقل إلى دورق معياري سعة لتر ويكمل بالماء .

٤ ـ ثيوسيانات بوتاسيوم : أذب ١٤٦ جم منها في ماء وأكمل إلى ٥٠٠ مل بالماء ، إذا وجدت عكارة فيرشح ويضاف ٢٠ مل أسيتون نقياً .

تقدير الهيموجلوبين (طريقة سيانو ميتهيموجلوبين) :

ضع ٥ مل دليل هيموجلوبين (أذب ١ جم بيكربونات صوديوم + ٠,٢ جم حديدي سيانيد بوتاسيوم + ٠,٠٥ جم سيانيد بوتاسيوم في ماء مقطر ، وأكمل إلى لتر في إناء بني بعيداً عن الضوء) في أنبوبة وأضف إليها ٠,٠٢ مل دماً ، واخلط جيداً . واتركها ١٠ دقائق ، ثم اقرأ الكثافة الضوئية على ٥٤٠ نانومتر ، مع ضبط الجهاز على الصفر بدليل الهيموجلوبين . يجرى نفس التقدير على محلول قياسي ، ويقدر تركيز الهيموجلوبين بالجرام / ١٠٠ مل دم = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times \text{تركيز الهيموجلوبين في المحلول القياسي٪}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$

وبدون استخدام محلول قياسي يمكن حساب تركيز الهيموجلوبين بهذه الطريقة بضرب الكثافة الضوئية للعينات × ٤٥٤,٥٤٥ ، بينما بأكسدة الهيموجلبين (٠,٠٢ مل دم) بمحلول حديدي سيانيد البوتاسيوم (٠,٦ ملي مولر) وتفاعله مع سيانيد البوتاسيوم (١ ملي مولر) (٥ مل من محلول التفاعل) والقياس على ٥٤٠ نانومتر تضرب القراءة في ٣٦,٨ لحساب تركيز الهيموجلوبين جم / ١٠٠ مل دم أو في ٢٢,٨ لحساب تركيز الهيموجلوبين كحديد ملي مول / لتر .

تقدير الميتهيموجلوبين :

في ظرف ٥ دقائق من جمع العينات يؤخذ ٠,٣ مل دم بالهيبارين ، وتخلط مع ٢٠ مل محلولاً منظماً درجة حموضته ٦,٩ (يحتوي ٤,٠٤ جم فوسفات بوتاسيوم أحادية + ٦,٥ جم فوسفات صوديوم ثنائية في اللتر) + نقطتان عن محلول سابونين ١٠ ٪ ، وبعد دقيقتين تقاس الكثافة الضوئية على طول موجة ٦٣٠ نانومتر في نصف المحلول . أضف إلى نصف المحلول الباقي نقطتين من محلول سيانيد بوتاسيوم ١٠ ٪ ، وقس الكثافة الضوئية على نفس طول الموجة . الفرق بين قراءتي الجهاز لكل عينة يضرب في ١٠٢,٥٦٤ للحصول على تركيز الميتهيموجلوبين (جم / ١٠٠ مل دم) .

ب ـ البروتين الكلى (طريقة البيوريت) فى الدم والأنسجة :

المحاليل :

١ ـ محلول كبريتات / كبريتيت : أذب ٢٠٨ جم كبريتات صوديوم لامائية و ٧٠ جم كبريتيت صوديوم لا مائية في ٩٠٠ مل ماء + ٢ مل حمض كبريتيك مركزاً ، ويجب أن تكون قيمة PH أعلى من ٧ ، ثم تنقل إلى دورق معياري ٢ لتر، ويكمل للعلامة بالماء .

٢ ـ دليل البيوريت Biuret : يذاب ٤٥ جم ملح روشيل Rochelle في ٤٠٠ مل صودا كاوية ٠,٢ عياري ، ويضاف إليها ١٥ جم كبريتات نحاس خماسي الماء مع التقليب المستمر لتمام الذوبان ، ثم يضاف ٥ جم يوديد بوتاسيوم ، ويكمل الحجم إلى لتر بالصودا الكاوية ٠,٢ عياري . يخفف الدليل بأخذ ٢٠٠ مل وتخفيفها إلى لتر بالصودا الكاوية ٠,٢ عياري المحتوية ٥ جم يوديد بوتاسيوم / لتر .

٣ ـ محلول بروتين قياسي : أذب ٥,٥ جم بروتين سيرم جافاً في ١٠٠ مل ماء .

اجر التقدير كالتالي :

١ ـ يؤخذ من العينة ٠,٤ مل ، وتضاف إلى أنبوبة محتوية ٦ مل محلول كبريتات / كبريتيت ، وتخلط ويؤخذ منها ٢ مل ، تضاف إلى ٥ مل محلول بيوريت . توضع الأنابيب في حمام مائي على ٣٧ْم لمدة ١٠ دقائق ، ثم تبرد لمدة ٥ دقائق على حرارة الغرفة ، تقاس الكثافة الضوئية على ٥٥٥ نانومتر .

٢ ـ تجرى تجربة خالية (بلانك) بإضافة ٢ مل محلول كبريتات / كبريتيت إلى ٥ مل دليل بيوريت ويكمل الخطوات كما في العينة .

٣ ـ يجرى عمل تقدير للبروتين القياسي بأخذ ٠,٤ مل من المحلول القياسي مع ٦ مل محلول كبريتات / كبريتيت . ويؤخذ من هذا المخلوط ٢ مل في أنبوبة أخرى مع ٥ مل دليل بيوريت ويكمل كما في العينة .

ويحسب تركيز البروتين في السيرم أو البلازما بالجرام/١٠٠ مل = $\frac{\text{قراءة العينة} \times ٥,٥}{\text{قراءة المحلول القياسي}}$

وتستخدم نفس طريقة البيوريت كذلك في تقدير البروتين الكلي في الأنسجة الطازجة كما في البلازما ، بأخذ ٠,١ جم عينة وتجنس مع ٥ مل ملح طعام تركيز ٠,٩ ٪ ، وترسيب البروتين فيها بإضافة ٥ مل محلول ١٠ ٪ من حمض ثلاثي كلورو الخليك ، يذاب البروتين المترسب في ٢ مل ماء ، ويقدر البروتين بعد ذلك كما في البلازما أي بإضافة ٥ مل من دليل البيوريت (المتكون من محلول أ : ٩ جم / لتر طرطرات صوديوم وبوتاسيوم + ٨ جم / لتر يوديد بوتاسيوم ، محلول ب : ١٥ جم / لتركبريتات نحاس ، يضاف ٥ مل من محلول أ إلى ٢٤٥ مل من محلول ب)، اخلط جيداً ثم اغل دقيقة ثم برد واقرأ الكثافة الضوئية بعد نصف ساعة على طول موجة ٥٥٠ نانومتر باستخدام مقارنة (٠,١ مل محلول ملح طعام + ٥ مل دليل بيوريت وأكمل كما في العينة) وكذلك محاليل قياسية متدرجة الحجوم ٠,٢-١,٠ مل (من محلول البيومين ماشية تركيز ١٠ مجم / ١٠ مل ماء) وأكمل إلى ١ مل بالمحلول الملحي واجر عليها كما في العينة والمقارنة .

جـ ـ الأزوت غير البروتيني في الدم :

يجرى ترسيب البروتين في الدم بتنجستات صوديوم (١٠ ٪) ، أو حامض ثلاثي كلورو خليك (١٠ ٪) ، ويؤخذ ١ مل من راشح الدم هذا مع ٠,٢ مل حمض كبريتيك مخففاً (١:١) محتوى ١ جم ثاني أوكسيد سلنيوم / ١٠٠ مل ، ويسخن على لهب بسيط حتى يروق المحلول ، فيبرد ويخفف إلى حوالي ٦ مل ، ويضاف إليها ٣ مل محلول نسلر ، وتخلط وتكمل بالماء إلى ١٠ مل ، وتقاس كثافتها الضوئية على ٤٨٠ نانومتر ضد عينة خالية (بلانك) من الأدلة والماء بدل العينة .

كما تقدر الكثافة الضوئية لمحلول قياسي من كبريتات الأمونيوم (٠,١٤١٤ جم / ١٠٠ مل وتخفف ١ : ١٠ فيحتوي ٠,٠٣ مجم أزوت / مل) بأخذ ١ مل منه مع ٦ مل ماء + ٣ مل محلول نسلر والرج والتقدير .

الاختلافات في النيتروچين غير البروتيني في الدم ترجع أساساً للاختلافات في أهم مكوناتها وهي اليوريا .

د ـ يوريا الدم (طريقة الأمينو بنزالدهيد) :

يخلط ٣ مل دم مع ١٢ مل محلول ١٠ ٪ من ثلاثي كلورو خليك ، وتترك ٥ دقائق ثم يرشح على ورق ترشيح عليه فحم نباتي ، ثم أضف ٠,٥ جم فحم إلى الراشح ، واخلط جيداً ، وأعد الترشيح . أضف ٥ مل راشحاً إلى ١ مل دليل بنزالدهيد (٥ جم بارا دي ميثيل أمينو بنزالدهيد تذاب في ٢٠ مل حمض هيدروكلوريك مركزاً ، ويضاف إليها بحذر

٨٠ مل ماء مقطراً ، وقلب ثم برد قبل الاستخدام ، واحفظ في زجاجة بنية اللون ، إذ يظل المحلول صالحاً للاستخدام لمدة شهر) ، واتركه يستقر ٥ دقائق على الأقل على درجة حرارة الغرفة .

عدّ تجربة مقارنة من ٤ مل حمض ثلاثي كلورو خليك (١٠٪) + ١ مل ماء + ١ مل دليل بنزالدهيد . بعد ٥ – ٦٠ دقيقة من إضافة الدليل تقرأ الكثافة الضوئية على ٤٢٠– ٤٣٠ نانومتر للعينة مع تصغير الجهاز على التجربة المقارنة ، وذلك ضد محلول قياسي (٦,٤٣ جم يوريا نقية جافة في ماء مقطر ، أضف ٤ مل كلوروفورم ، وأكمل إلى لتر بالماء . خفف ٥ مل منه إلى ١٠٠ مل بالماء ، واستخدم هذا المحلول كمحلول قياسي تركيزه ٠,٣ مجم يوريا / مل . هذا التخفيف الأخير صالح لمدة أسبوع) يجرى عليه نفس الخطوات التي أجريت على التجربة بإحلال ٠,٠٥ مل محلولاً قياسياً محل الدم . احسب

تركيز اليوريا مجم أزوت يوريا / ١٠٠ مل دم = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٣٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$

ولما كانت يوريا الدم تشكل حوالي نصف تركيز النيتروچين غير البروتيني ، فإن تقدير يوريا الدم يعطي نفس المعلومات كما لو قدرنا النيتروچين غير البروتيني ، بل البعض يفضل استخدام يوريا الدم ، وإن كان في حالة المرض الشديد للكبد يميل الدم لاحتواء تركيز منخفض من اليوريا وتركيز مرتفع من الأحماض الأمينية ، مما يجعل اليوريا تشكل نسبة أقل من النيتروچين غير البروتيني .

يوريا الدم (طريقة دي أستيل مونوكسيم) :

خذ ٠,١ مل دماً مع ٣,٣ مل ماء + ٠,٨ مل تنجستات صوديوم ١٠٪ + ٠,٣ مل حمض كبريتيك ٠,٦ عياري ، واخلط واطرد مركزياً . خذ ١ مل رائقاً مع ١ مل ماء + ٠,٤ مل دليلاً (٢ جم دي أسيتيل مونوكسيم تذاب في ٦٠ مل ماء + ٢ مل حمض خليك ثلجي ، ورج للذوبان مع التدفئة البسيطة ، وأكمل بالماء إلى ١٠٠ مل) + ١,٦ مل مخلوط أحماض (١٥٠ مل حمض فوسفوريك ٨٥٪ تضاف إلى ١٤٠ مل ماء ، وتخلط ثم يضاف ٥٠ مل حمض كبريتيك مركزاً ببطء مع التقليب) . ضع في حمام ماء يغلي لمدة ٣٠ دقيقة ، ثم برد واقرأ الكثافة الضوئية على ٤٨٠ مليميكرون . اجر نفس الاختبار على ١ مل من محلول قياسي (٢٥٠ مجم يوريا تذاب في ١٠٠ مل ، ثم يخفف ١ مل منه إلى ١٠٠ مل فيكون تركيزه ٠,٠٢٥ مجم يوريا / مل) .

احسب تركيز اليوريا مجم / ١٠٠ مل = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٠,٠٢٥ \times ١٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times ٠,٠٢٥}$

ويلاحظ أن اليوريا $CO\,(NH_2)_2$ وزنها الجزيئي ٦٠ ، وتحتوي ذرتي نيتروچين ، وعليه

فمن الخطأ التعبير أحياناً عن اليوريا بأزوت اليوريا ، إذ إن مجم يوريا

$$= \text{مجم نيتروچين اليوريا} \times \frac{٦٠}{٢٨}$$

$$= \text{نيتروچين اليوريا} \times ٢,١٤$$

ويزيد تركيز يوريا الدم في حالات أمراض الكلى المختلفة ، وارتفاع ضغط الدم ، والتسمم الزئبقي ، وزيادة نشاط غدد جارات الدرقية ، وزيادة ڤيتامين D ، وزيادة اختزان الكالسيوم. بينما نقص يوريا الدم نادر الحدوث ، وقد يرافق أمراض الكبد الشديدة والحمل.

وللحكم على كفاءة عمل الكلى ، يجب كذلك تحليل البول لمحتواه من اليوريا ، فزيادة محتوى البول من اليوريا تشير إلى كفاءة عمل الكلى ، إذ لا يتوفر ذلك في وجود فشل كلوي ، إلا أنه قبل الفشل الكلوي ، وفي حالات الجفاف ، وانسدادات الأمعاء المزمنة ، أو الإسهال لمدد طويلة يصاحبها ارتفاع تركيز يوريا الدم والبول معاً .

يوريا الدم (طريقة الهيبوكلوريت) :

حضن ٠,٠٢ مل سيرم أو بلازما مع ٠,٢ مل محلول منظم يورياز (أذب ١٥٠ مجم يورياز (نشاطه ١٠٠٠ وحدة / جم) في ١٠٠ مل محلول ١٪ EDTA (حامض) في ماء مضبوط درجة تركيز أيون الهيدروچين ٦,٥ ، ويمكن حفظه في ثلاجة لمدة شهر) على ٣٧°م لمدة ١٥ دقيقة ، ثم أضف ٥ مل محلول نيتروبروسيد صوديوم فينول (٥٠ جم فينول + ٠,٢٥ جم نيتروبروسيد صوديوم في لتر وتخفف منه ١ : ٥ عند الاستعمال ، ويحفظ لمدة شهرين في ثلاجة في زجاجة بنية) ، واخلط وأضف ٥ مل محلول هيبوكلوريت (٢٥ جم هيدروكسيد صوديوم + ٢,١ جم هيبوكلوريت في لتر ماء ، ويخفف ١ : ٥ عند الاستعمال وهو صالح لمدة شهرين في زجاجة بنية في ثلاجة) ، وضعها في حمام مائي على ٣٧°م لمدة ١٥ دقيقة . يجرى عمل تجربة خالية ، وكذلك نفس الخطوات تجرى على محلول قياسي (١ مجم / مل) واقرأ الكثافة الضوئية على ٦٣٠ نانومتر ، واحسب تركيز اليوريا مجم / ١٠٠ مل $= \frac{\text{قراءة العينة} \times ١٠٠}{\text{قراءة المحلول القاسى}}$

يوريا الدم والبول (طريقة دي أسيتيل مونوكسيم) :

يؤخذ ٠,١ مل بلازما أو سيرم وتخفف إلى ١٠ مل بالماء ، يؤخذ منها ١ مل ويضاف إليها ١ مل ماء . يجرى نفس الشيء مع محلول قياسي . كما يؤخذ في أنبوبة ثالثة ٢ مل مقطراً للتجربة الخالية يضاف إلى كل من أنابيب العينة ، والمحلول القياسي ، والتجربة الخالية ٢ مل دليلاً ملوناً مخلوطاً ، واخلط جيداً ، ثم أضف ٢ مل دليل حامض مخلوط ، واخلط ثانية ، ضع الأنابيب في حمام ماء يغلي ٢٠ دقيقة ، واقرأ الكثافة الضوئية على ٥٢٠ نانومتر . اللون ثابت لمدة ٢٤ ساعة في الظلام على حرارة الغرفة .

احسب تركيز يوريا البلازما مجم / ١٠٠ مل = $\frac{\text{قراءة العينة} \times ٢٠٠}{\text{قراءة المحلول القياسي}}$

لتقدير يوريا البول تجرى نفس الخطوات على بول مخفف ٢٠ مرة ، ويحسب التركيز بنفس المعادلة مضروبة في ٢٠ .

الدلائل :

١ ـ دليل الحمض المخلوط : ٠,٥ مل دليل أ (٥ جم كلوريد حديديك مذابة في ٢٠ مل ماء ، ويضاف إليها ببطء ١٠٠ مل حمض فوسفوريك ٨٥٪ ، وأكمل إلى ٢٥٠ مل بالماء) تضاف إلى لتر من دليل ب (٢٠٠ مل حمض كبريتيك مركزاً يضاف ببطء إلى ٥٠٠ مل ماء ، وأكمل إلى ٢ لتر بالماء) .

٢ ـ دليل ملون مخلوط : أضف ٦٧ مل دليل ملون أ (٥ جم دي أسيتيل مونوكسيم تذاب في ٢٥٠ مل ماء وترشح) مع ٦٧ مل دليل ملون ب (٥ جم ثيوسيمي كاربازيد تذاب في لتر ماء) ويكمل الحجم بالماء إلى لتر .

٣ ـ محلول قياسي : ٥٠ جم يوريا تذاب في لتر ماء يؤخذ منها ١٠ مل وتخفف إلى ٢٥٠ مل بمحلول مخفف حافظ (٠,٠٤ جم خلات زئبقيك فينيل تذاب في ٢٥٠ مل ماء بالتسخين ، ويضاف إليها ٠,٣ مل حمض كبريتيك مركزاً ، وأكمل إلى لتر بالماء) .

هـ ـ أمونيا الدم والبول :

يتأكسد الفينول بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم ، ويكون لوناً أزرق مع الأمونيا في وجود نيتروبروسيد الصوديوم كعامل مساعد .

يؤخذ ٠,١ مل دماً (مضافاً إليه الهيبارين) ، وتضاف مباشرة إلى ٠,١ مل محلول ثالث كلورو خليك ، واخلط واطرد مركزياً . يؤخذ من الرائق ٠,٠٥ مل ويضاف إليها ٠,٥ مل دليل فينول + ٠,٥ مل دليل هيبوكلوريت . يجرى نفس الشيء على محلول قياسي ، وكذلك على ماء (كتجربة خالية) . اترك كل الأنابيب لمدة ٣٠ دقيقة على ٣٧ْم ، ثم اقرأ الكثافة الضوئية على ٦٢٣ نانومتر ، واحسب تركيز الأمونيا كنيتروجين أمونيومي بالميكروجرام / ١٠٠ مل دم = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٢٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}}$

تقدر أمونيا البول بنفس الأسلوب ، باستخدام بول بدون أي مادة حافظة ، ويخفف ١٠٠ مرة قبل إجراء أي خطوة ، ويحسب التركيز كذلك من نفس المعادلة السابقة مضروبة في ١٠٠ (التخفيف) .

الدلائل المستخدمة :

١ ـ دليل الفينول : ١٠ جم فينول مبلور + ٥٠ مجم نيتروبروسيد صوديوم تذاب في

ماء مقطر ، وأكمل إلى لتر .

٢ ـ هيبوكلوريت صوديوم : ٢٠ جم هيبوكلوريت كالسيوم تعلق في ١٠٠ مل ماء ، وتخلط مع ٢٥ جم كبريتات صوديوم (١٠ جزيئات ماء) مذابة في ٥٠٠ مل ماء . بعد الترسيب اسحب الرائق واحفظه في ثلاجة ، فهو صالح لمدة أسبوع واحد . اختبر تركيز الكلور النشط في هذا المحلول بأخذ ١ مل منه + ٥ مل ماء مقطراً وملوق من يوديد البوتاسيوم ، وتخلط معاً في دورق مخروطي ، وحمض بحمض الكبريتيك ٥ عياري ، نقط بمحلول ٠,١ عياري ثيوكبريتات صوديوم (٢,٤٨ جم في ٥٠ مل ماء ، وأكمل إلى ١٠٠ مل ، وعاير ضد محلول ثاني كرومات بوتاسيوم ٠,١ عياري) حتى زوال اللون البني، أضف نقطاً من دليل نشا ١ ٪ وأكمل المعايرة . احسب إجمالي حجم الثيوكبريتات الذي ينبغي أن يكون ٢,٨٢ مل ، فإن زاد أو قل ، تزيد أو تقل كمية هيبوكلوريت الصوديوم المستخدمة في تحضير دليل الهيبوكلوريت .

٣ ـ دليل الهيبوكلوريت : ٩٠ جم فوسفات صوديوم ثنائية + ٦ جم هيدروكسيد صوديوم تذاب في ٥٠٠ مل ماء ، ويضاف إليها ١٠٠ مل هيبوكلوريت صوديوم ، وأكمل إلى لتر بالماء .

٤ ـ محلول حمض ثلاثي كلورو خليك : ١٠ جم منه مع ١,٣ جم هيدروكسيد صوديوم تذاب في ١٠٠ مل ماء ، وتحفظ في ثلاجة .

٥ ـ محلول قياسي : ٤٧٢ مجم كبريتات أمونيوم جافة تذاب في ماء ، وتكمل إلى لتر بالماء ، ويؤخذ منها ٢ مل وتكمل إلى ١٠٠ مل بالماء (٢٠٠ ميكروجرام أزوت أمونيومي / ١٠٠ مل) .

وترتفع أمونيا الدم لفشل الكبد في تحويلها إلى يوريا ، كما في أمراض تليف الكبد ، والغيبوبة الكبدية مما يؤثر على المخ وتنشأ اضطرابات عصبية .

و ـ حمض اليوريك في الدم :

اخلط ١مل سيرم مع ٨مل ماء + ٠,٥ مل حمض كبريتيك ٠,٦٦ عياري + ٠,٥ مل تنجستات صوديوم ١٠ ٪ . اترك ١٠ دقائق لتمام ترسيب البروتين . رشح وخذ ٤ مل من الراشح مع ١ مل كربونات صوديوم ١٤ ٪ + ١ مل دليلاً (١٠٠ جم تنجستات صوديوم يوضع عليها ٣٢ مل حمض فوسفوريك ٨٥٪ مخلوطة مع ١٥٠ مل ماء ، واخلط واغل ساعة تحت مكثف عاكس ، وقبل نهاية فترة الغليان يضاف قليل من البروم لإزالة اللون ، واغل لطرد الزيادة من البروم ، ثم برد وخفف إلى ٥٠٠ مل) ، اترك ١٥ دقيقة على حرارة الغرفة ، واقرأ الكثافة الضوئية على ٦٨٠ نانومتر ، مع ضبط الجهاز على تجربة ،

خالية ، وعمل نفس التقدير على محلول قياسي (زن ١ جم حمض يوريك في دورق ، وفي دورق آخر ٠,٦ جم كربونات ليثيوم مع ١٥٠ مل ماء ، ورج ٥ دقائق ورشح وسخن على ٦٠ْم ، أيضاً سخن الدورق الذي به حمض اليوريك بتيار ماء دافئ ، انقل محلول كربونات الليثوم الدافئ إلى حمض اليوريك ، ورج لذوبان حمض اليوريك ، مع استمرار التدفئة أسفل صنبور ماء ساخن ، والرج المستمر ٥ دقائق ، ثم أكمل الرج أسفل تيار ماء بارد ، وأضف ٢٠ مل فورمالين ٤٠٪ ، وأضف ٣٣٠ مل ماء ، ومع الرج أضف ٢٥ مل حمض كبريتيك عياري ، وأكمل بالماء إلى لتر . هذا المحلول يحتوي ١ مجم حمض يوريك لكل ١ مل، ويجب حفظه بعيداً عن الضوء، فيستمر صالحاً على الأقل ٥ سنوات. خفف ١ مل منه بالماء إلى ٢٥٠ مل ، يستمر المخفف صالحاً للعمل عدة أيام وتركيزه ٠,٠٢ مجم حمض يوريك / ٥ مل) .

يزيد حمض اليوريك في الدم في حالات النقرس ، والفشل الكلوي ، والروماتزم (إذ تترسب اليورات الصلبة في وحول المفاصل) ، وهدم أنوية الخلايا نتيجة زيادة ميتابوليزم البروتينات النووية (كما في مرض سرطان الدم Leukaemia) وفي حالة تسمم الحمل .

ز ـ الأحماض الأمينية في البلازما :

تبقع رقائق كروماتوجرافي بالبلازما ، ومحاليل قياسية من الأحماض الأمينية، بمقدار ٢ ميكروليتر من كل منها ، وتطور في مخلوط بيوتانول / أسيتون / حمض خليك / ماء (٣٥/٣٥/٧/٢٣) لمدة حوالي ساعة ، أو مسافة حوالي ٨ سم على الأقل ، ثم تستخرج الرقائق ، وتجفف بالهواء الساخن . يخلط مخلوط التطوير بمقدار ٣ مل دليلاً (٤٠٠ ملي مولر ننهيدرين في بيوتانول / أسيتون ٥٠/٥٠ ، يحفظ في ثلاجة ، ويصير صالحاً حتى ٣ شهور) ، وتوضع فيه الرقائق الجافة ثانية ، وتطور لنفس المدة والمسافة . تستخرج الرقائق ، وتجفف بالهواء الساخن ، ثم في فرن تجفيف على ٨٠ْم لمدة دقيقة ، فتظهر الأحماض الأمينية (عدا البرولين والهيدروكسي برولين) كمناطق زرقاء اللون . ولتقييم الرقائق تترك بعد خروجها من الفرن ١٠ دقائق في الضوء (إذا لم تفحص الرقائق في الحال فتجفف هوائياً فقط وتحفظ في ثلاجة والرقائق وجهها لبعض) ، وإذا كان لون شرائط الأحماض الأمينية باهتاً فتطول فترة التجفيف ، وإذا كانت الأرضية داكنة فتكون درجة حرارة التجفيف أو مدة التجفيف أعلى من اللازم .

ولإظهار البرولين والهيدروكسي برولين تبلل فُرشة رسم بدليل البرولين (٥٧ ملي مولر بارا – دي ميثيل أمينو بنزالدهيد في مخلوط خلات إيثيل / حمض فوسفوريك ٨٥٪ / حمض خليك / ماء (١٠/٣٤/٦/٥٠)) ، وتمسح بها الرقيقة سابقة المعاملة بالننهيدرين عند ارتفاع منطقة الألانين والجليسين بموازاة خط النهاية الذي وصل إليه مخلوط التطوير

من قبل ، وتسخن الرقيقة ٣ دقائق في فرن تجفيف على ١١٠°م ، تظهر مناطق البرولين والهيدروكسي برولين بلون أحمر واضح إذا كانت بتركيز كاف .

حدود الكشف عن الأحماض الأمينية بالمليجرام / ١٠٠ مل هي ٣ (تربتوفان ، هيدروكسي برولين) ، ٤ (إيزوليوسين ، تيروزين ، برولين ، أرجنين ، سيستين) ، ٥ (ميثونين ، جليسين ، سيرين ، أورنيثين)، ٦ (ليوسين) ٧ (جلوتاميك ، ثريونين)، ١٠ (ألانين ، ڤالين) ، ٣٠ (هيستيدين) . هذا وتذاب الأحماض الأمينية القياسية في بروبانول / ماء ٣٠/٧٠ . وتضطرب صورة الأحماض الأمينية في البلازما والبول في كثير من الأمراض خاصة في اضطرابات الميتابوليزم المرافقة للجنون ، وأمراض الكبد ، فيزيد تركيز معظم الأحماض الأمينية في حالات الجنون ، بينما تزيد تركيزات الأسبارتيك والجلوتاميك والجليسين والميثونين والفينيل ألانين والسيرين في حالات التهاب الكبد ، وتزيد الأحماض الميثونين وفينيل ألانين والبرولين والسيرين والثريونين والتيروزين والسيترولين في حالة تليف الكبد .

نيتروچين الأحماض الأمينية في الدم :

يحضر راشح دم معامل بالتنجستات (١ :١٠) كما هو متبع في تحاليل الدم المختلفة ، وينقل ٥ مل من هذا الراشح خالي البروتين إلى أنبوبة اختبار ، وفي أنبوبة أخرى ينقل ٥ مل محلول قياسي للأحماض الأمينية يحتوي ٠,٠٣ مجم أزوت أحماض أمينية (يحتوي جليسين وحمض جلوتاميك : ٠,٢٦٨ جم جليسين نقي جاف مذاب في ماء + ٣٥ مل حمض هيدروكلوريك عياري + ١ جم بنزوات صوديوم ، وأضف ماء حتى ٥٠٠ مل . أذب ٠,٥٢٥ جم حمض جلوتاميك جاف نقي في ماء + ٣٥ مل حمض هيدروكلوريك عياري + ١ جم بنزوات صوديوم وخفف إلى ٥٠٠ مل بالماء . اخلط هذين المحلولين القياسيين فيحتوي ١ مل من المخلوط على ٠,١ مجم أزوت أحماض أمينية، وللعمل خفف ٣مل من هذا المخلوط بالماء إلى ١٠٠ مل ، فيحتوي هذا المخفف على ٠,٠٣ مجم أزوت أحماض أمينية / ٥ مل ، وهو ثابت لمدة أسبوع واحد إذا حفظ في ثلاجة ، بينما المخلوط الأول ثابت بلا حدود) ، وفي أنبوبة ثالثة (بلانك) أضف ٥ مل ماء ، ثم أضف إلى كل أنبوبة نقطة واحدة من محلول ٠,٢٥ ٪ فينولفثالين كحولي ، ثم نقط بالصودا الكاوية ٠,١ عياري حتى يظهر لون قرنفلي ثابت ، اضبط حجم الأنابيب إلى حجم واحد فيها جميعاً ، بإضافة الماء إذا لزم . أضف إلى جميع الأنابيب ١ مل محلول بوراكس (١,٥ ٪ صوديوم تترابورات يحتوي ١٠ جزيئات ماء يذاب منه ١٥ جم في لتر ماء)، واخلط ثم أضف ١مل محلول نافثوكوينون طازجاً التحضير (٠,٢٥ جم بيتا – نافثوكوينون – ٤ – حمض سلفونيك تذاب في ماء وتخفف إلى ٥٠ مل) واخلط ، وضع الأنابيب في حمام ماء يغلي ١٠ دقائق ، ثم برد في حمام ماء بارد ٥ دقائق . أضف ١ مل محلول

فورمالدهيد حمضي (خفف ١١,٣ مل فورمالدهيد ٤٠ ٪ إلى لتر بالماء ، ثم اخلط ٤ حجوم منه مع ٣ حجوم حمض هيدروكلوريك ١,٥ عياري + حجم حمض خليك ثلجي) اخلط ثم أضف ١ مل محلول ثيوكبريتات ٠,١ عياري (أذب ٢٥ جم بلورات ثيوكبريتات صوديوم في ماء وخفف إلى لتر) خفف في التو إلى ١٥ مل بالماء ، واخلط ثم اترك نصف ساعة، ثم اقرأ الكثافة الضوئية على ٤٩٠ ملي ميكرون ، واحسب تركيز الأحماض الأمينية في العينة مجم نيتروجين أحماض أمينية / ١٠٠ مل دم أو بلازما =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٠,٠٣ \times ١٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times ٠,٥}$$

يرتفع تركيز الأحماض الأمينية في الدم في حالة تليف الكبد ، ونكرزة الكبد الحادة ، وفي الفشل الكلوي المتقدم ، بينما ينخفض بحقن الأنسولين .

ح ـ أزوت النترات في الدم واللبن والبول والكرش :

الدم :

يجمع الدم في وجود ملح ثنائي صوديوم EDTA كمانع للتجلط (٢ مجم / مل) ، ويجمد أو يحفظ في ثلاجة لحين التحليل . انقل ٥ مل دم مع ٣٥ مل ماء واخلط ، ثم أضف ٥ مل تنجستات صوديوم ١٠ ٪ واخلط ، ثم أضف ٥ مل حمض كبريتيك ٠,٦٦ عياري (١٩ مل تخفف إلى لتر بالماء) واخلط ، واترك ٢٠ دقيقة ، ثم اطرد مركزياً أو رشح على ورق ترشيح خالي النترات . اسحب ٢٥ مل من الرائق ، وأضف إليها ١ مل دليل فضة / نحاس (أذب ٢٠ جم كبريتات نحاس خماسي الماء مع ١ جم كبريتات فضة في ١٠٠ مل ماء) ، واخلط واترك ٢٠ دقيقة ، أضف حوالي ٠,٣ جم كالسيوم هيدروكسيد + ٠,٣ جم كربونات ماغنسيوم ، واخلط واترك ١٠ دقائق ، واطرد مركزياً . انقل ١٠ مل رائقاً للتقدير .

اللبن :

أضف ثاني كرومات صوديوم كمادة حافظة (٦٤ مجم / لتر) ، وخزن العينات في ثلاجة لحين التحليل ، أو تحلل العينات طازجة في الحال ، فيخفف ١٠ مل لبناً بمقدار ٢٠ مل ماء مقطراً ورسب البروتين بإضافة ١٠ مل تنجستات صوديوم ١٠ ٪ + ١٠ مل حمض كبريتيك ٠,٦٦ عياري واخلط عقب كل إضافة . اترك ٢٠ دقيقة ، ثم اطرد مركزياً أو رشح . انقل ٣٥ مل رائقاً مع ٢ مل دليل فضة / نحاس ، واخلط ثم اترك ٢٠ دقيقة ، ثم رسب الزيادة من الفضة وكذلك النحاس بإضافة ٣٣ مجم هيدروكسيد كالسيوم ومثلها كربونات ماغنسيوم . استخدم ١٠ مل من الرائق للتقدير .

البول وسائل الكرش :

انقل ٢ مل بولاً ، أو ناتج ترشيح سائل كرش مع ٢ مل دليل فضة / نحاس ، ثم خفف إلى ٢٠ مل بالماء المقطر ، واخلط واترك ٢٠ دقيقة أضف ٣٣ مجم هيدروكسيد كالسيوم ، ومثلها من كربونات ماغنسيوم ، واخلط عدة مرات خلال ١٠ دقائق ، ثم اطرد مركزياً . انقل ١٠ مل رائقاً للتقدير .

وللتقدير في هذه العينات : ينقل حجم معلوم من الرائق للعينة إلى قمع فصل ، وتخفف إلى ٢٠ مل بالماء المقطر ، وأضف ١ مل دليل زيلينول (٢ جم من ٣-٤ زيلينول ٣-٤- دي إيثيل فينول تذاب في ١٠٠ مل أسيتون) ، واخلط ثم أضف ٦٠ مل(٣+١) حمض كبريتيك (٣٠٠ مل حمض مركز تضاف إلى ١٠٠ مل ماء مقطراً وبرد قبل الاستخدام) ، واخلط واترك ٢٠ دقيقة . خفف بمقدار ٢٠ مل ماء مقطراً ، واخلط واترك ليبرد . أضف ٢٥ مل رابع كلوريد كربون ، ورج بشدة ٣٠ ثانية ، واترك لفصل الطبقات. انقل طبقة رابع كلوريد الكربون إلى كأس ، واسكب الطبقة المائية ، اغسل قمع الفصل بماء مقطر واسكبه ، واسمح للقمع بالجفاف بالتصفية . انقل إلى القمع ١٠-٥٠ مل (حسب محتوى النترات) صودا كاوية ٠,٤ ٪ ، وأضف إليها مستخلص رابع كلوريد الكربون ، ورج بشدة ٣٠ ثانية . أهمل طبقة رابع كلوريد الكربون ، ورشح مستخلص هيدروكيسد الصوديوم أصفر اللون ، وقدر كثافته الضوئية على ٤٢٠ نانومتر ضد ماء ، مع تقدير الكثافة الضوئية لمحلول نترات قياسي (٠,٠٤٠٨ جم نترات بوتاسيوم / لتر ماء + ١ مل كلورفورم كمادة حافظة ، يحتوي هذا المحلول على ٢٥ ميكروجرام نترات / مل) .

ط ـ الكرياتينين Creatinine :

يقدر الكرياتينين بعد ترسيب البروتين في العينات (سيرم أو بلازما من دم مضافاً إليه الهيبارين) . ولترسيب البروتين يوضع ١ مل سيرم (أو بلازما) في أنبوبة طرد مركزي + ١,٥ مل ماء مقطراً + ٠,٥ مل محلول تنجستات صوديوم ١٠ ٪ + ١ مل حمض كبريتيك ٠,٦٦ عياري واخلط واطرد مركزياً .

وللتقدير : يؤخذ في أنابيب اختبار ١,٥ مل رائقاً من العينة التي تم ترسيب بروتينها (أو من المحلول القياسي ١٠ مجم / لتر ، أو من الماء المقطر للعينة الخالية) + ٠,٥ مل محلول هيدروكسيد صوديوم ٠,٧٥ عياري + ٠,٥ مل محلول حمض بيكريك ٠,٠٤ عياري .

اخلط وانتظر ٢٠ دقيقة بالضبط ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٥٢٠ نانومتر

$$\text{تركيز الكرياتينين مجم / لتر} = \frac{\text{قراءة الجهاز للعينة} \times ٤٠}{\text{قراءة الجهاز للمحلول القياسي}}$$

$$\text{ميكرومول / لتر} = \frac{\text{قراءة الجهاز للعينة} \times ٣٥٣,٦}{\text{قراءة الجهاز للمحلول القياسي}}$$

وفي البول يتم التقدير مباشرة دون ترسيب البروتين ، لكن تخفف العينة بنسبة ١ :١٠٠ ، ويؤخذ منها مباشرة ١,٥ مل + ٠,٥ مل صودا كاوية ٠,٧٥ عياري + ٠,٥ مل حمض بيكريك ٠,٠٤ عياري ، وتخلط وتترك ٢٠ دقيقة ، ثم تقدر كثافتها الضوئية على ٥٢٠ نانومتر ويحسب التركيز بنفس الطريقة مع الأخذ في الاعتبار معامل التخفيف .

ولتقدير الكرياتينين في اللحوم ومنتجاتها تجنس عينة معلومة الوزن مع حجم معلوم من الماء البارد خالي الأمونيا ، ثم يرسب بروتين ناتج التجنيس بالغليان مع حمض ، ثم رشح وخفف إلى حجم معين ، واجر عليه كما هو عاليه ، ثم يحسب الكرياتين بضرب الكرياتينين فى ١,١٦ .

ي ــ النيتروچين الكلى للبول :

يقدر نيتروچين البول الكلي بالجرام / ٢٤ ساعة ، بعد تقديره في عينة (٠,٥ - ٥ مل حسب الطريقة) بأي من طرق الميكروكلداهل ، أو الماكروكداهل ، وقد يتم التقدير بمحلول نسلر (ضوئيًا) أو بالمعايرة . وينقسم النيتروچين الكلي في البول إلى نيتروچين يوريا (حوالي ٨٥ ٪) ، ونيتروچين أمونيا (حوالي ٣ ٪) ، وكرياتينين (حوالي ٧ ٪) ، وفي حيوانات أخرى (كالطيور) يكون حمض اليوريك الجزء الأعظم من أزوت البول .

وقد ينخفض أزوت البول في حالة انخفاض بروتين العليقة ، كما يرتفع تركيز أزوت البول في حالة غنى العليقة بالبروتين . وفي الحالات الطبيعية يكون إخراج الأزوت الكلي في البول والروث (في الحيوانات البالغة) مساويًا للنيتروچين المأكول وهذا ما يطلق عليه بالاتزان الأزوتي (ميزان محايد) . وأزوت البول مفترض خلوه من البروتين ، فإذا وجد البروتين في البول دل على أمراض الكلى والجهاز البولي والقلب .

ك ــ يوريا البول :

تقدر بنفس طريقة تقديره في الدم ، سواء بالمونوكسيم ، أو باليورياز ، أو بطريقة الانتشار.

ويزيد تركيز اليوريا في البول في حالات الاضطرابات المرتبطة بزيادة هدم الأنسجة وفي الحميات ، بينما تقل اليوريا في البول في حالات اضطرابات الكلى والكبد ، نتيجة خفض تكوينها وضآلة القدرة على إخراجها .

وتقدير اليوريا في البول ينبغي أن يصاحبه تقدير لليوريا في الدم ، لما له من قيمة كدليل في وظيفة الكلية (في اختبار تنقية اليوريا) .

وتتراوح قيمة أزوت اليوريا ما بين ٨٠-٩٠ ٪ من الأزوت الكلي في البول ، حسب مستوى بروتين العليقة ، فزيادة بروتين العليقة يرفع تركيز يوريا البول إلى حوالي ٩٠ ٪ ، بينما النقص الشديد في بروتين العليقة مع ارتفاع طاقتها الحرارية يؤدي إلى خفض أزوت

يوريا البول إلى حوالي ٦٠٪ من الأزوت الكلي في البول .

ل ـ أمونيا البول :

تقدر بنفس طرق تقديرها في الدم ، والأمونيا التي تخرج في البول هي الأيون الحر NH_4^+، والذي يتكون في الطلائية نتيجة نزع مجاميع الأمين من الأحماض الأمينية ، وانتشار الأمونيا حرة في البول ، حيث تتحد مع أيون الهيدروچين مكونة الأيون الحر ، الذي لا يمكنه الانتشار عكسياً للجسم. ويتحكم مستوى أمونيا الدم في معدل تكوين الأمونيا NH_3، والتي هي الأخرى يتحكم فيها تركيز أيون الهيدروچين ، وعليه فيتأثر إخراج الأمونيا في حالة القلوية ، أو في حالة التغذية على أعلاف تكون قواعد ، بينما يزيد إخراج الأمونيا في حالة الحموضة (فيما عدا الحموضة الكلوية الناتجة من هدم الأنابيب الكلوية) واستهلاك أعلاف تكون الأحماض .

م ـ حمض اليوريك فى البول :

يقدر بطرق تقديره في الدم ، ويزيد إخراجه في البول نتيجة تناول أعلاف غنية بالبيورينات ، أو ما يطلق عليها بحمض اليوريك الخارجي (أعلاف بروتينية) ، أو يزيد إخراجه لهدم أنسجة الجسم وما يحتويها من مواد نووية (حمض يوريك داخلي) . وتركيز حمض اليوريك في البول ذو أهمية في تكوين حصوات حمض اليوريك ، والتي تذيبها الكربونات القلوية ، وكذا السترات ، التي ترفع قيمة PH البول ، فتقلل القدرة على تكوين هذه الحصوات .

خذ ١٥٠ مل بولاً في كأس ، وأضف إليها مع التقليب ٣٠ مل محلول ٠,٦٪ كلوريد حديديك ، رشح وانقل ١٢٠ مل راشحاً إلى كأس جاف يحتوي ٢٥ جم كلوريد أمونيوم. بعد تمام الذوبان يضاف ٥ مل أمونيا مركزة . قلب ١٠ دقائق ، وتترك تستقر ١٠ دقائق أخرى لتكوين يورات أمونيوم ، فترشح ويغسل الراسب مرتين بمحلول كبريتات أمونيوم ١٠٪ (قلوية بالأمونيا) . ينقل الراسب الجاف تماماً بماء ساخن إلى دورق معياري ، ويكمل بالماء إلى ١٠٠ مل . يضاف ٢٠ مل حمض كبريتيك ٤٥٪ عندما يكون المحلول على حوالي ٦٥ْم ، ويعاير المحلول ببرمنجنات البوتاسيوم ٠,٠٥ عياري حتى نقطة الانتهاء البنفسجية الفاتحة التي يستمر لونها ١-٢ ثانية .

١ مل برمنجنات بوتاسيوم ٠,٠٥ عياري تعادل ٣,٧ مجم حمض يوريك ، فإذا كان حجم البرمنجنات المستخدمة في المعايرة = ح ، فإن تركيز حمض اليوريك مجم / ١٠٠ مل بول = ح × ٣,٧ .

ن ـ كرياتينين البول :

يقدر بنفس طرق تقديره في الدم ، ويختلف تركيزه في البول بتأثير العليقة لحد بسيط

فقط ، وفي حالة احتواء العلائق على كميات معنوية من الكرياتينين (ارتفاع محتوى العليقة من اللحوم) ، وهو مخلف غير قابل لاستفادة الجسم منه ، وهو لا يتأثر بمستوى ميتابوليزم النيتروجين ؛ لذلك فهو ثابت تقريباً ، ويعكس ثبات العمليات الميتابوليزمية في الجسم ، والتي يدخل فيها كرياتين الجسم (والذي يكون غالباً الكرياتينين) . وإخراج الكرياتينين يرتبط بوزن الجسم (لأنه يخلق من كرياتين العضلات) لاحتوائها على الفوسفوكرياتين ، ويزيد إخراجه بكثرة العمل العضلي ، نتيجة تحرره من مخزون العضلات؛ لذلك يعبر عن إخراج الكرياتينين بالمليجرام / كجم وزن جسم / يوم أكثر من التعبير عن تركيزه في بول ٢٤ ساعة بالمليجرام . ويختلف إخراج الكرياتينين بالعمر ، إذ يزيد بزيادة العمر ، كما يزيد بضعف العضلات ، ويزيد جداً بضمور العضلات ، ويرتفع إخراجه كذلك في الحميات . ويعبر عن تركيزي الكرياتينين والكرياتين معاً بالمليجرام نيتروچين خارج في البول / كجم وزن جسم ويعبر عنه بمعامل الكرياتينين . هذا ويزيد إخراج الكرياتين في حالات الحمل ، والصيام ، وكثرة شرب الماء ، وسوء التغذية ؛ وليس لإخراج الكرياتين علاقة بكرياتين العليقة ؛ لأنه يمتص تماماً .

س ــ اختبارات الترويق :

وقد يجري اختبار من اختبارات التنقية، والتي يقدر فيها تركيز مادة ما (كاليوريا ، أو الكرياتينين ، أو كلوريد الأمونيوم ، أو الأنيولين ، أو الثيوكبريتات ، أو بارا أمينوهيبورات أو غيرها) سواء الموجودة بالجسم أو تحقن في الوريد، ويقدر تركيزها في الدم وفي البول ، مع تقدير حجم البول الخارج في الدقيقة ، ويحسب الترويق أو التنقية Clearance من المعادلة :

$$\text{الترويق} = \frac{\text{مجم / ١٠٠ مل بول} \times \text{مل بول خارج / دقيقة}}{\text{مجم / ١٠٠ مل دم}}$$

وذلك للاستدلال على كفاءة عمل الكلى وأنابيبها ، ولما كان الجلوكوز يعاد امتصاصه كاملاً في الأنابيب الكلوية ، فإن ترويقه مساوي للصفر ، بينما المواد التي تخرج من الأنابيب الكلوية وترشحها الحويصلات الكلوية يكون ترويقها عال ، وهذه المواد غالباً تكون غريبة ، وتحقن في الدم مثل أحمر الفينول ، وديودراست Diodrast ، وبارا أمينوهيبورات (والمركبان الأخيران ترويقهما أعلى كثيراً عن أحمر الفينول) ، وأنيولين ، ومانيتول ، وثيوكبريتات الصوديوم؛ لأنها لا توجد طبيعياً في الجسم .

وأبسط التقديرات تتم باستخدام محلول معقم من ثيوكبريتات الصوديوم (١٠ ٪) ويحقن في الوريد ببطء واستمرار طول مدة الاختبار ، ويجمع الدم والبول لتقدير تركيز الثيوكبريتات كالتالي:

الدم :

يضاف ٢ مل بلازما إلى ١٤ مل ماء ، واخلط ثم أضف ٢ مل تنجستات صوديوم

٠,٣٣ عياري + ٢ مل حمض كبريتيك ٠,٦٧ عياري . اترك دقائق قليلة ، ثم اطرد مركزياً أو رشح . اسحب ١٠ مل راشحاً ، وأضف إليها ١٠ مل يودات بوتاسيوم ٠,٠١ عياري (٠,٣٥٦٧ جم / لتر ماء) + ٢ مل حمض هيدروكلوريك ٢ عياري . اترك ٥ دقائق ، ثم أضف ٢ مل يوديد بوتاسيوم (١٠ ٪ طازج) ، وعاير اليود المتحرر في الحال بواسطة محلول ثيوسلفات صوديوم ٠,٠١ عياري (محضر طازج من محلول ٠,١ عياري) في وجود دليل نشا (١ ٪) . اجر معايرة قياسية على ماء بدلاً من الراشح . احسب تركيز الثيوكبريتات مجم / ١٠٠ مل بلازما =

$$\frac{(\text{حجم الثيوكبريتات في المعايرة القياسية} - \text{حجم الثيوكبريتات في معايرة العينة}) \times ١,٥٨ \times ١٠ \times ١٠٠ \times ١٠}{\text{حجم الثيوكبريتات في المعايرة القياسية} \times ١٠ \times ٨}$$

البول :

خذ ٥ مل بول ، وأضف إليها نقط دليل فينولفثالين ونقط صودا كاوية عيارية حتى يصير قلوي . أضف ٢٥ مل يودات ٠,٠١ عياري + ٢ مل يوديد + ٢ مل حمض هيدروكلوريك ، وعاير بالثيوكبريتات ٠,٠١ عياري . عاير ٢٥ مل يودات ٠,٠١ عياري كمحلول قياسي ، واحسب تركيز الثيوكبريتات مجم / ١٠٠ مل بول =

$$\frac{(\text{حجم الثيوكبريتات في معايرة المحلول القياسي} - \text{حجم الثيوكبريتات في معايرة العينة}) \times ١,٥٨ \times ٢٥ \times ١٠٠}{\text{حجم الثيوكبريتات في معايرة المحلول القياسي} \times ٥}$$

اختبار التخفيف :

من أبسط الاختبارات التي تجرى للكشف عن أمراض الكلى ، أو وظيفة الكلى هو اختبار التخفيف ، أي قدرة الكلى على إنتاج بول مركزاً أو إخراج بول مخففاً . فيبعد ماء الشرب من المساء ، ويستبعد البول الساعة السابعة صباحاً ، ثم يقدم ١٢٠٠ مل ماء للشرب لمدة نصف ساعة . يجمع البول كل ساعة ، أي الساعة ٨ ، ٩ ، ١٠ ، ١١ صباحاً ويقدر حجم كل جمعة ، وكثافتها النوعية . في حالة تلف وظائف الكلى يفشل الحيوان في إخراج بول مخففاً (ولا جمعة على الأقل تعطي كثافة منخفضة تصل إلى ١,٠٠٣ أو أقل) ، كما يخرج حجم قليل من البول قد لايصل إلى ٨٪ (مما استهلكه في الشرب) ، وكثافته عالية قد تصل إلى ١,٠١٠ أو أعلى .

ع ـ أزوت الزرق :

نظراً لخروج حمض اليوريك (البول) مع زرق الدواجن فإنه لتقدير أزوت الزرق لحساب معامل هضم البروتين ينبغي أولاً التخلص من أزوت البول ، وذلك على النحو التالي :

١ ـ يؤخذ ٢ جم مخلفات دواجن جافة ، ويضاف إليها ٧٠ مل ماء مقطراً في كأس ٣٠٠ مل + ٢٠ مل بورات صوديوم (أذب ٥٠ جم حمض بوريك + ١٠٠ جم هيدروكسيد صوديوم في ٣٥٠ مل ماء مقطراً) + ٦ مل برمنجنات بوتاسيوم (أذب ٣١,٦ جم برمنجنات بوتاسيوم في ٩٧ مل ماء) .

٢ ـ ضع الكأس على حمام مائي (٥٠°م) ، وقلب لمدة ساعة بساق زجاجية .

٣ ـ اترك الكأس ساعة يستقر على درجة حرارة الغرفة .

٤ ـ أضف ٣٠ مل محلول حامض ثلاثي كلوروخليك (١٠ ٪) ، وقلب بساق زجاجية.

٥ ـ اترك الكأس ساعة أخرى على درجة حرارة الغرفة ، ثم رشح على ورق ترشيح خالي الرماد ، واغسل ٤ مرات كل مرة ٢٥-٣٠ مل محلول حامض ثلاثي كلوروخليك (٢٠ ٪) مع الضغط على ورق الترشيح بالساق الزجاجية لتخليص الراسب من المحلول .

٦ ـ ورقة الترشيح المحتويه على العينة يتم تجفيفها في فرن (٩٠°م) ، ثم تهضم الورقة بمحتوياتها باتباع طريقة كلداهل لتقدير النيتروچين (أي نيتروچين الزرق بعد التخلص من أزوت البول) .

وهناك طريقة أخرى لفصل حمض اليوريك (بأكسدته) من زرق الدواجن لتقدير بروتين الزرق وهذه الطريقة تعتمد على أكسدة الحمض إلى allantoin ببرمنجنات البوتاسيوم، ثم ترسيب البروتين بخلات اليورانيل . البروتين المرسب يعكس البروتين الخام غير المهضوم في الزرق . ويجرى التقدير بأخذ ١ جم زرق مطحون جاف يوزن في كأس ٢٥٠ مل ، ويبلل بقليل من الميثانول لتشتيت الحامض acid dispersion . يضاف ٥٠ مل ماء مقطراً ، ثم ٤٠ مل محلولاً منظماً PH_8 (٦١ جم حمض يوريك + ٤ جم هيدروكسيد صوديوم / لتر) ، وكم كاف من محلول برمنجنات البوتاسيوم ٠,١ عياري ليعطي ٢ مل لكل ١٠ مجم أزوتاً كلياً في العينة . يوضع الكأس في حمام مائي على ٥٠ ± ٠,٥°م ، ويقلب ميكانيكياً ٣٥ دقيقة، وبعد ذلك مباشرة يضاف ٢٥ مل محلول خلال يورانيل (٦٨ جم / لتر) ، وتغلى العينة وتترك ليلة لتبرد وتترسب .

ثاني يوم ترشح العينة ، ويغسل المتبقي بمقدار ٢٥٠ مل خلال يورانيل (١ ٪) على حرارة الغرفة . وتنقل ورقة الترشيح بالمتبقي عليها إلى دورق كلداهل للهضم بحمض الكبريتيك باستخدام عامل مساعد من كبريتات البوتاسيوم والنحاس . ويضرب المحتوى الأزوتي في ٦,٢٥ ليعطي بروتين الزرق الخام غير المهضوم .

ف ـ حمض اليوريك (لونيا) :

يتم تقديره في زرق الطيور ، والعلائق المحتوية على زرق الطيور على النحو التالي :

١ ـ تؤخذ عينة علف بالضبط (٤ – ٥ جم) ، ويستخلص منها الدهن بالإيثير البترولي (نقطة غليانه ٤٠–٦٠°م) ثم تنقل العينة منزوعة الدهن كمياً إلى دورق مستدير القاعدة سعة ١٥٠ مل ، ثم يزال المذيب بواسطة الهواء .

٢ ـ تؤخذ عينة العلف منزوعة الدهن (أو ٠,٤ جم زرق طيور جاف مباشرة دون نزع الدهن) ويضاف عليها ٦٠ مل محلول فورمالدهيد إيثانولي (يؤخذ حجم من محلول الفورمالدهيد يحتوى ١٧,٥ جم فورمالدهيد مع ٢٥٠ مل ماء + ٥٠٠ مل إيثانول ، ويضبط تركيز أيون الهيدروچين في المحلول إلى PH ٧ بمحلول هيدروكسيد صوديوم ٠,١ عياري ، ثم يخفف إلى لتر بالماء ويخلط ويعاد اختبار PH ويجرى أولاً اختبار قوة محلول الفورمالدهيد ، بخلط ٣ مل من محلول الفورمالدهيد مع ٥٠ مل هيدروكسيد صوديوم عياري مع ٢٥ مل محلول فوق أكسيد الهيدروچين ٢٠ ٪ ، ويسخن حتى يقف الفوران ، فيبرد ويعاير بحامض هيدروكلوريك عياري في وجود دليل فينولفثالين ، مع إجراء معايرة مقارنة Blank بوضع ٣ مل ماء بدلاً من الفورمالدهيد حيث إن :

١ مل هيدروكسيد صوديوم ١ ع $\equiv$ ٠,٠٣ جم فومالدهيد ،

قوة محلول الفورمالدهيد $\equiv$(المقارنة – العينة) × $\frac{٠,٠٣ \times ١٠٠}{٣}$ جم / ١٠٠ مل

أي $\equiv$ الفرق بين حجمي الحامض المستخدمين في معايرة المقارنة والعينة .

٣ ـ ضع مكثفاً عاكساً على الدورق وسخن على حمام بخار لمدة ساعة . برد ورشح على دورق معياري ١٠٠ مل مع غسيل الدورق الأول ٣ مرات × ١٠ مل من محلول فورمالدهيد ميثانولي ، وينقل الغسيل على بوتقة الترشيح إلى الدورق المعياري ، وأكمل إلى العلامة بالفورمالدهيد الإيثانولي واخلط .

٤ ـ انقل بواسطة ماصة ٢٠ مل من مستخلص العينة إلى أنبوبة طرد مركزي سعة ٥٠ مل ، وأضف إليها ١٠ مل دليل بنيديكت وهيتشكوك Benedict and Hitchcock (اخلط ٣٥ مل لاكتات فضة (أذب بالتسخين ٣ جم لاكتات فضة في ٥٠ مل ماء + ١ مل حمض لاكتيك ، وخفف إلى ١٠٠ مل بالماء ، ورشح واحفظ في آنية داكنة ولا تعرض لضوء شديد) مع ١٥ مل محلول ماغنسيوم أمونيومي (أذب ١٧,٥ جم كلوريد أمونيوم في ٥٠ مل ماء وأضف ٣٠ مل محلول أمونيا كثافة ٠,٨٨ جم / مل ، واخلط وخفف إلى ١٠٠ مل بالماء) ثم أضف ٥٠ مل محلول أمونيا كثافة ٠,٨٨ جم / مل ، واخلط جيداً مع تحضيره ، مباشرة قبل الاستخدام) .

٥ ـ اخلط جيداً ، واتركه في الظلام لمدة ساعة . اطرد مركزياً على ٢٠٠٠ لفة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة ، ثم اسحب الطبقة الرائقة ، واجعلها تصفى لمدة ١٠ دقائق ، مع سحب أي سوائل متبقية دون اضطراب الراسب ، ثم أضف ٢٠ مل محلول ثيوكبريتات صوديوم (٢٥

جم ثيوسلفات صوديوم خماسي الماء / لتر) .

٦ ـ أذب الراسب بالتقليب بساق زجاجية ، وانقل بماصة ٥ مل من هذا المحلول إلى دورق مدرج سعة ٢٠٠ مل يحتوي ٤٠ مل محلول منظم سكسينات (أذب بالتسخين ٢٩,٥ جم حمض سكسينك في ٧٥٠ مل ماء + ٢٠ مل محلول هيدروكسيد صوديوم (٥٠ جم / ٥٠ مل ماء) . برد ثم أضف كمية محلول فورمالدهيد تحتوي ١٧,٥ جم فورمالدهيد، اخلط جيداً ، ثم اضبط PH إلى ٦ بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (١٠٠ ٪)، خفف إلى لتر بالماء ، واخلط وأعد ضبط PH إلى ٦ إذا لزم) .

٧ ـ خفف إلى ٢٠٠ مل بالماء ، واخلط وقس الامتصاص على ٢٩٤ نانومتر ضد مقارنة (محضرة بخلط ٥ مل محلول ثيوكبريتات الصوديوم مع ٤٠ مل محلول منظم سكسينات ، وخفف إلى ٢٠٠ مل بالماء) . وقدر كمية حمض اليوريك الموجودة في العينة من منحنى قياسي .

٨ ـ تحضر أنابيب سعة ٥٠ مل ينقل إليها ٢ ، ٤ ، ٦ ، ٨ ، ١٠ ، ١٢ مل من محلول قياسي حمض اليوريك (٢٥٠ مجم حمض يوريك تنقل إلى دورق مستدير القاعدة سعة ١٥٠ مل ، ويثبت عليه مكثفاً عاكساً، وأضف ١٠٠ مل محلول فورمالدهيد إيثانولي واغلي تحت المكثف العاكس لمدة ٣٠ دقيقة مع الرج باستمرار . برد ثم انقل إلى دورق ٢٥٠ مل واغسل الدورق الأول بالفورمالدهيد الإيثانولي ، واجمع الغسيل مع محلول حمض اليوريك ، وخفف إلى ٢٥٠ مل بالفورمالدهيد الإيثانولي واخلط ، ١ مل يحتوي ١ مجم حمض يوريك) وأكمل إلى ٢٠ مل بالفورمالدهيد الإيثانولي . أضف إلى كل أنبوبة ١٠ مل محلول بنيدكيت وهيتشكوك واخلط جيداً ، واتركها ساعة في ظلام ، وأكمل كما في العينات بداية من خطوة رقم ٥ حتى خطوة رقم ٧ ، وارسم المنحنى القياسي للعلاقةبين التركيز والامتصاص .

٩ ـ محتوى أزوت حمض اليوريك كنسبة مئوية في العينة = مجم حمض يوريك في مستخلص العينة / (وزن العينة بالجرام × ٦) .

ص ـ كولاچين Collagen :

قد يستدعي الأمر تقدير الكولاچين في مستخلص عظام الحيوانات فيقدر بتقدير الحمض الأميني هيدروكسي برولين وضربه في ٧,٢٥ ، وبقسمة الكولاچين على ٥,٥٥ ينتج نيتروچين الكولاچين ، كما أن البروتين غير الكولاچيني عبارة عن أزوت البروتين غير الكولاچيني مضروباً في ٦,٢٥ ، والنيتروچين البروتيني غير الكولاچيني عبارة عن النيتروچين الكلي مطروحاً منه نيتروچين الكولاچين والنيتروچين غير البروتيني .

١٠ ـ دلائل جودة السمك المبرد والمثلج :

أ ـ ثلاثي ميثيل أمين :

تحتوي معظم الأسماك البحرية على أوكسيد ثلاثي ميثيل أمين للتنظيم الأسموزي ، وتختلف تركيزاته حسب النوع والقطيع والمنطقة والوقت من السنة .

وأثناء تبريد السمك البحري يختزل أوكسيد ثلاثي ميثيل الأمين بفعل بكتريا الجهاز الهضمي إلى مركب عطري (ذي رائحة) هو ثلاثي ميثيل أمين ، ويتناسب مستوى هذا المركب طردياً مع أعداد بكتريا Pseudomonads ؛ لذلك يؤخذ من هذا المركب دليل على التلف البكتيري في الأسماك .

وتعد طريقة حمض البكريك هي أكثر الطرق استخداماً في تقدير ثلاثي ميثيل الأمين ، رغم بعض التداخل الذي قد ينشأ من الأمينات وبخاصة ثاني ميثيل الأمين إذا كانت العينة متجمدة أو إذا كانت في مرحلة متقدمة من التلف ؛ لذا يستخدم معها محاليل بوتاسا كاوية أو كربونات بوتاسيوم لتحرير ثلاثي ميثيل الأمين ، أو يستخدم التحليل بأجهزة الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (أو الضغط) .

وللتقدير بحمض البكريك تجرى الخطوات التالية :

١ ـ اخلط ٥٠ جم عينة مع ١٠٠ مل محلول ثلاثي كلورو الخليك ٧,٥٪ ، ثم اطرد مركزياً على ٤°م لمدة ١٥ دقيقة بسرعة ٤٠٠٠ لفة / دقيقة ، (ويمكن الترشيح بدلاً من الطرد المركزي) ويرشح الرائق على صوف زجاجي ، ويمكن تجميد (-٢٠°) المستخلص حتى التقدير .

٢ ـ انقل من المستخلص في أنبوبة ذات غطاء حجماً معلوماً ، وفي أنابيب أخرى حجوم متدرجة (١-٣ مل) من محلول قياسي ١٠ ميكروجرام أزوت ثلاثي ميثيل أمين / مل بإذابة ٠,٦٨٢ جم ثلاثي ميثيل أمين - حمض هيدروكلوريك (مجفف ليلة في مجفف) في ١٠٠ مل ماء مقطراً ويخفف منه ١ مل إلى ١٠٠ مل ويحفظ في ثلاجة .

٣ ـ أضف ماء إلى كل الأنابيب حتى يصل الحجم الكلي إلى ٤ مل ، وللبلانك استخدم ٤ مل ماء مقطراً .

٤ ـ أضف ١ مل فورمالدهيد ١٠٪ (بتخفيف ٢٦,٨ مل فورمالين إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر) و ١٠ مل تولوين مجففاً خلال كبريتات صوديوم لامائية و ٣ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ٢٥٪ (٢٥ جم بوتاسا كاوية في ٧٥ مل ماء) . وتأكد من درجة الحرارة لتكون ٣٠°م .

٥ ـ اخلط ١٥ دقيقة على هزاز ، انقل ٧ مل من الطبقة العليا (تولوين) إلى أنبوبة تحتوي ٠,٣ - ٠,٤ كبريتات صوديوم لامائية وهزها برفق .

٦ ـ اسحب ٥ مل من حمض البكريك (٢ جم حمض بكريك مجففة ليلة في مجفف على حرارة الغرفة تذاب في تولوين خالي الرطوبة وتخفف إلى ١٠٠ مل بالتولوين الجاف ثم يخفف منها ١ مل إلى ١٠٠ مل بالتولوين الجاف) في أنبوبة جافة نظيفة (وألا يظهر لون أصفر دليل تلوث الأنبوبة) ، وعليها ٥ مل تولوين من خطوة رقم ٥ السابقة ، اخلط برفق ، وقدر الكثافة الضوئية على ٤١٠ نانومتر .

ب ـ القواعد الطيارة الكلية Total Volatile bases :

أثناء تبريد وتخزين السمك تنشط العمليات الميكروبيولوجية والتغييرات الكيماوية مؤدية إلى تدهور الخواص الحسية للسمك ، وعلى الأخص الهدم الإنزيمي (بكتيري وطبيعي أي ذاتي) للبروتينات وأوكسيد ثلاثي ميثيل الأمين في الأنواع البحرية مؤدياً إلى تكوين مركبات عطرية هي الأمونيا ، أحادي ميثيل أمين ، ثالث ميثيل أمين ، وأمينات طيارة أخرى .

وتقدير القواعد الطيارة الكلية يشمل قياس القواعد الطيارة منخفضة الوزن الجزيئي والمركبات الأمينية الناتجة من عملية نزع مجاميع الكربوكسيل من الأحماض الأمينية ميكروبيولوجيا ، وذلك للحكم على جودة الأسماك الطازجة ؛ إذ ترتبط هذه المكونات بالجودة الحسية للسمك Organoleptic quality ، فهناك ارتباط بين القواعد الطيارة الكلية وثلاثي ميثيل أمين الذي يزيد تركيزه بإطالة فترة حفظ السمك .

ويتلخص التقدير في تقطير المركبات الأمينية على حمض بوريك ، ومعايرته بحمض عياري ، وتحضر العينة في شكل مستخلص إيثانولي أو في حمض ثلاثي كلوروخليك أو حمض بيركلوريك . وأكثر الطرق استخداماً هي بأوكسيد الماغنسيوم أو كبريتات الماغنسيوم، مع الحرص على سرعة التقدير للعينة المحفوظة في ثلج في ظرف ساعتين وإلا تجمد (-٣٠م) فتظل صالحة حتى أسبوعين للتحليل .

ويجري التقدير باستخدام أوكسيدالماغنسيوم على النحو التالي :

١ ـ ضع ١٠ جم عينة + ٣٠٠ مل ماء مقطراً ، واخلط في خلاط ، ثم انقلها إلى دورق تقطير مع ٢ جم أوكسيد ماغنسيوم ، وصل للتقطير .

٢ ـ دورق مخروطي يحتوي ٢٥ مل من حمض البوريك ٢٪ ونقط من دليل أحمر الميثيل / بروموكريزول جرين ، لاستقبال ناتج التقطير .

٣ ـ يعمل على تسخين دورق التقطير ليغلي في ١٠ دقائق بالضبط ، وعلى نفس معدل التسخين يستقبل المتقطر في القابلة لمدة ٢٥ دقيقة .

٤ ـ عاير المتقطر المستقبل باستخدام حمض كبريتيك ٠,٠٥ عياري .

٥ ـ اجر عينة بلانك واحسب القواعد الطيارة الكلية بالمليجرام نيتروجين/ ١٠٠ جم عينة:

= (حجم الحامض للعينة – حجم الحامض للبلانك) × العيارية × ١٤ × ١٠٠
―――――――――――――――――
وزن العينة جم

وتتماثل طريقة كبريتات الماغنسيوم مع الطريقة المذكورة سابقاً ، غير أنه في طريقة الكبريتات يستخدم ٣٠ جم عينة ، ويستخدم في الخلط والاستخلال محلول كبريتات ماغنسيوم ٢٠٠ مل (٦٠٪ في محلول مائي محمض بحمض كبريتيك ٦ عياري ٢٠ مل للتر) ، ثم يجرى الترشيح وضبط الحموضة بحمض كبريتيك ١ عياري إلى PH ٢ (أو بصودا كاوية ١ عياري) ، ويتم تقطير ٢٥ مل من المستخلص بالطريقة السابقة ، مع المعايرة بحمض هيدروكلوريك ٠,١ عياري ويجرى الحساب كالتالي :

مجم أزوت قواعد طيارة كلية / ١٠٠ جم =

(حجم الحامض للعينة – حجم الحامض للبلانك) × العيارية × ١٤ × ١٠٠ × عامل
―――――――――――――――――
وزن العينة جم

جـ – هيبواكزانثين Hypoxanthine :

أحد النيوكليوتيدات المستخدمة في الحكم على جودة السمك وهو أكثر امتيازاً عن القياسات الكيماوية الأخرى كثلاثي ميثيل أمين ، ثنائي ميثيل أمين ، قواعد طيارة كلية وغيرها مما يشير للتلف البكتيري في السمك ؛ إذ إن تراكم الهيبواكزانثين في الأنسجة يعكس أول أطوار الهدم الذاتي Autolytic deterioration وآخر أطوار التلف البكتيري ، علاوة على أن الهيبواكزانثين لا يتأثر في تقديره بالحرارة أو الإشعاع ، وهو يناسب كذلك الأسماك في المياه العذبة منخفضة أو منعدمة المحتوى من أوكسيد ثلاثي ميثيل أمين ما يجعل تقدير ثلاثي ميثيل أمين عديم الأهمية في هذا الحال .

ويشجع نقص الأدينوزين ثلاثي الفوسفات على بدء التيبس الرمي وما يصاحبها من تغييرات كيماوية حيوية كالتالي :

أدينوزين ثلاثي الفوسفات ← أدينوزين ثنائي الفوسفات ← أدينوزين أحادي الفوسفات ← إينوسين أحادي الفوسفات ← إينوسين ← هيبواكزانثين ← إكزانثين ← حمض يوريك.

فبتقدير هيبواكزانثين نقف على معدل التدهور الحادث في عضلات السمك ، وعادة يجرى التقدير بإنزيم إكزانثين أوكسيداز Xanthine oxidase الذي يحول هيبواكزانثين إلى اكزانثين ثم إلى حمض يوريك . وتطورت طرق التقدير باستخدام صبغة دليل redox ، أو شرائط ورق ، أو بالتحليل الإنزيمي الضوئي . وتقديره كروماتوجرافيا أكثر دقة من تقديره إنزيمياً . وتختلف قيم الهيبواكزانثين باختلاف أجناس السمك ، وطرق تحضير العينات ، وبالاختلافات في العوامل البيئية .

وللتقدير الإنزيمي تجرى الخطوات التالية :

١ ـ اخلط ٥٠ جم عينة سمك مجنسة لمدة ٢ دقيقة مع ٢٠٠ مل حمض بيركلوريك ٦٪ ، اترك المخلوط يستقر عدة دقائق ، رشح المستخلص ، واجمع من الراشح ٥٠ مل وعادلهم وجمدهم (-٣٠°م) لحين التحليل .

٢ ـ قبل التحليل لابد من معادلة المستخلص بقدر مساو من محلول منظم فوسفات / هيدروكسيد بوتاسيوم (٢٧,٢٢ جم بوتاسيوم هيدروجين أورثوفوسفات مع ماء + ١٧١ مل هيدروكسيد صوديوم ١ مولر واضبط PH إلى ٧,٦ بحمض الأورثوفوسفوريك أو الصودا الكاوية ثم أضف ٥٥٧ مل هيدروكسيد بوتاسيوم ١ مولر وأكمل بالماء إلى ١ لتر) إلى PH ٧-٧,٦ مع العلم أن الأمينات يمكن فقدها في الوسط القلوي . والمستخلص المتعادل غير ثابت لفترة طويلة بالتبريد ؛ لذا يحفظ بالتجميد (-٣٠°م) .

٣ ـ ضع في أنبوبة (أ) ١ مل من المستخلص المتعادل + ٢ مل محلول منظم فوسفات (٠,٠٥ مولر PH ٧,٦ بإذابة ١٧,٠١ جم بوتاسيوم هيدروجين أورثوفوسفات في ماء ويضبط PH بالصودا الكاوية ١ مولر ويخفف بالماء إلى ٥٠٠ مل . التخفيف خمسة أضعاف يعطي تركيزاً ٠,٠٥ مولر) + ٢ مل ماء .

٤ ـ في أنبوبة أخرى (ب) ضع ١ مل مستخلصاً متعادلاً + ٢ مل محلولاً منظماً + ١,٥ مل ماء + ٠,٥ مل إنزيماً (يخفف ١٠ مجم/مل إكزانثين أوكسيداز تجاري بمحلول منظم فوسفات تركيز ٠,٠٥ مولر ، ويجرى التخفيف مباشرة قبل الاستخدام ، والإنزيم المخفف يحفظ بالتجميد فيصير صالحاً حتى ٦ شهور ، والتخفيف يجرى بنسبة ١ : ٥٠) .

٥ ـ حضن الأنابيب في حمام مائي ٣٠ دقيقة على ٣٧°م ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٢٩٠ نانومتر ، واحسب الزيادة في الامتصاص = امتصاص الأنبوبة (ب) + امتصاص البلانك (ماء ٣ مل + محلول منظم ٢ مل)- امتصاص بلانك آخر (٢,٥ مل ماء + ٢ مل محلول منظم + ٠,٥ مل إنزيم) - امتصاص الأنبوبة (أ) ثم احسب تركيز الإكزانثين بالمول / جم عينة بمعلومية كمية الهيبواكزانثين بالميكروجرام المستخرجة من المنحنى القياسي والمقابلة للزيادة في الامتصاص المحسوبة =

ميكروجرام هيبواكزانثين من المنحنى القياسي × [مل حمض بيركلوريك للاستخلاص +
(٠,٠١ × ٪ رطوبة في السمك × وزن العينة جم)]
—————————————————
مل مستخلص مضافاً للأنبوبة × وزن العينة جم

× مل محلول منظم فوسفات/ بوتاسا كاوية للمعادلة + مل مستخلص تم معادلته بالمحلول المنظم/ بوتاسا
—————————————————
مل مستخلص تم معادلته بالمحلول المنظم / بوتاسا

١
───────────────────
وزن جزيئي جرامي للهيبواكزانثين (١٣٦,١)

٥ ـ ولعمل المنحنى القياسي تحضر الأنابيب التالية :

الأنبوبة	مـل هيبواكزانثين قياسي	مــل مـاء مقطر	مــل محلول منظم	مــل إنزيم	ميكروجرام تركيز الهيبواكزانثين
١	٠,٢	٢,٣	٢,٠	٠,٥	١٠
٢	٠,٤	٢,١	٢,٠	٠,٥	٢٠
٣	٠,٦	١,٩	٢,٠	٠,٥	٣٠
٤	٠,٨	١,٧	٢,٠	٠,٥	٤٠
٥	١,٠	١,٥	٢,٠	٠,٥	٥٠
٦	٠,٢	٢,٨	٢,٠	—	—
٧	—	٢,٥	٢,٠	٠,٥	—
٨	—	٣,٠	٢,٠	—	—

وتحضن الأنابيب ٣٠ دقيقة في حمام مائي على ٣٧°م ثم يقاس الامتصاص على طول موجة ٢٩٠ نانومتر واحسب الزيادة في الامتصاص للمحاليل القياسية في الأنابيب ١ ـ٥ بجمع امتصاص كل أنبوبة على حدة (من أنابيب ١ ـ٥) على امتصاص أنبوبة ٦ ويطرح منهما امتصاص كل من أنبوبة ٧ و ٨ .

وتوقع الزيادة في الامتصاص في الأنابيب ١ ـ٥ على محور صادي ، بينما التركيزات المقـابلة بالميكروجـرام على المحـور السـيني ويمد الخط الممـثل للعـلاقـة بين الزيادة في الامتصـاص والتـركيـز ، ومن هذا المنحنى ستستخرج تركيزات العينات بالميكروجرام لاستخدامها في حساب تركيزات العينات بالمول / جم كما سبق ذكره . علماً بأن المحلول القياسي تركيز ٥ مجم / ١٠٠ مل يحضر بإذابة ٥ مجم هيبواكزانثين في ١٠٠ مل ماء ويقلب ليلة لتمام الذوبان .

ولا تختلف طريقة الكروماتوجرافي إلا في الجهاز المستخدم للفصل والتقدير ؛ إذ يحقن الجهاز (كروماتوجرافي سائل عالي الأداء) بالمحاليل القياسية التي يتم تطويرها وفصلها على العمود (RP-8 Reverse Phase) بواسطة محلول منظم بوتاسيوم فوسفات PH ٤,٥ ، ويقدر على كاشف الجهاز على طول موجة ٢٥٤ نانومتر ، ومنها يرسم المنحنى القياسي.

وتستخلص العينات كما سبق في الطريقة السابقة ، وتقدر كما في المحلول القياسي ، وتستخلص تركيزات العينات بالميكرو مول / جم =

١٤,٧١ (ثابت للتخفيف عند المعادلة ١ : ١) × ارتفاع المنحنى للعينة (م) × حجم البيركلوريك المستخدم في الاستخلاص × عامل التخفيف للمستخلص المتعادل / ميل المنحنى القياسي (م / ميكروجرام) × الحجم المحقون في الجهاز (مكيرولتر) × وزن العينة (جم) .

د ـ تقدير واحد لثلاثي ميثيل أمين / ثنائي ميثيل أمين :

يمثل أكسيد ثلاثي ميثيل أمين في عديد من الأنواع البحرية مركباً ذا وظائف فسيولوچية تشبه وظائف اليوريا وحمض اليوريك في الحيوانات الأرضية ، أي يخرج من الحيوان لحفظ ميزان الأزوت ، إلا أن هذا المركب نادراً ما يوجد بل قد يغيب من الأسماك للمياه العذبة ، فهو بأعلى تركيزاته في كلاب البحر والقروش ، ومتوسط التركيز في الأسماك العظمية ، ومنخفض جداً في الرخويات . ومن الأسماك العظمية ، ما يحتوي أعلى التركيزات (أسماك القد ، pollock ، haddock ، whiting ، hake ، Cusk) بينما الأسماك المفلطحة (موسى) فتركيز أكسيد ثلاثي ميثيل الأمين بها هي الأقل ، وأسماك المياه العذبة قيمها مهملة لشدة انخفاضها .

وينهدم هذا المركب تلقائياً بواسطة إنزيم ثلاثي ميثيل أمين أكسيداز الموجود طبيعياً إلى ثاني ميثيل أمين وفورمالدهيد . ووجود الفورمالدهيد يخفض قابلية البروتين للاستخلاص ، ويضر بقوام السمك وخواصه الطبيعية (الحسية) . ولما كان الفورمالدهيد صعب الاستخلاص كمياً ، فإن قيمة ثاني ميثيل الأمين يعتبر دليلاً على جودة السمك المجمد من الأنواع مرتفعة النشاط الإنزيمي (ثلاثي ميثيل أمين أكسيداز) .

وتحت ظروف التثليج تعمل إنزيمات البكتريا على هدم أكسيد ثلاثي ميثيل أمين إلى مركب برائحة الأمونيا (ثالث ميثيل أمين) والذي يعبر مستواه عن جودة السمك وصلاحيته للاستهلاك .

وفي تقدير ثالث ميثيل أمين بطريقة البيكرات يحدث فيها تداخل من ثاني ميثيل أمين ، إلا أن ذلك غير مهم ، لأن ثالث ميثيل أمين يقدر للسمك المبرد وليس للسمك المجمد ، إلا أنه في الحقيقة قد يحتوي السمك المجمد كذلك كلّ من ثالث وثاني ميثيل أمين ؛ لذلك يؤدي استخدام هيدوركسيد البوتاسيوم ٢٥ ٪ بدلاً من كربونات البوتاسيوم إلى إزالة معظم تداخل ثاني ميثيل أمين .

وقد استخدمت معاملات إذابة ثالث وثاني ميثيل أمين في الكربونات وهيدوركسيد البوتاسيوم في طريقة البيكرات كأساس لتقدير واحد لكل من ثالث وثاني ميثيل أمين في

السمك المخزن لفترة طويلة بالتبريد ثم بالتجميد خاصة على درجة حرارة تشجع على تكوين ثاني ميثيل أمين (عادة أعلى من -٣٠°م) . فتتفاعل الأمينات مع حمض البيكريك منتجاً لوناً أصفر من البيكرات التي تستخلص بالتولوين ، ومع كربونات البوتاسيوم يتطلب ثاني ميثيل أمين قدر ٥ أضعاف المطلوب من ثالث ميثيل أمين لإحداث التفاعل اللوني مع حمض البيكريك ، ومع البوتاسا الكاوية يتطلب قدراً أكبر . وللتقدير تجرى الخطوات التالية:

١ ـ يحضر مستخلص العينة بخلط ٥٠ جم عينة مع ١٠٠مل حمض ثالث كلورو خليك ٧,٥٪ ، ثم تطرد مركزياً على ٤°م لمدة ١٥ دقيقة بسرعة ٤٠٠٠ لفة / دقيقة (أو ترشح) ويرشح الرائق على صوف زجاجي ويحفظ بالتجميد (-٢٠°م) لحين التحليل.

٢ ـ أول تحليل بطريقة البوتاسا الكاوية ، بسحب ٠,١ - ٤ مل مستخلصاً في أنبوبة بغطاء . عد محاليل قياسية منفصلة لكل من ثالث وثاني ميثيل أمين بسحب صفر ، ٠,٥ ، ١,٠ ، ١,٥ ، ٢,٠ ، ٢,٥ مل من المحاليل القياسية (ثالث أو ثاني ميثيل أمين ٠,٠١ مجم أزوت / مل في ماء) في أنابيب بأغطية لتعطي صفراً ، ٠,٠٠٥ ، ٠,٠١ ، ٠,٠١٥ ، ٠,٠٢٠ ، ٠,٠٢٥ مجم أزوتاً أمينياً . أضف ماء إلى كل الأنابيب حتى حجم ٤ مل ، مع عمل بلانك من ٤ مل ماء مقطراً . أضف ١ مل فورمالدهيد ١٠٪ ، ١٠ مل تولوين ، ٣ مل بوتاسا كاوية ٢٥٪ ، مع الحرص أن تكون الحرارة على ٣٠°م .

غطّ الأنابيب واخلطها على جهاز لفاف ١٥ دقيقة . اسحب ٧ مل من طبقة التولوين العليا إلى أنبوبة تحتوي ٠,٣ - ٠,٤ جم كبريتات صوديوم لامائية ، رج برفق حتى روقان المحلول .

اسحب ٥ مل من حمض البيكريك (٠,٢ مجم / مل في تولوين) في أنبوبة جافة نظيفة (وألا يظهر لون أصفر لتلوثها) . اسحب ٥ مل محلول تولوين من الخطوة السابقة (المجفف بالكبريتات) إلى الأنبوبة المحتوية على حمض البيكريك واخلط برفق ، قدر الكثافة الضوئية على ٤١٠ نانومتر .

٣ ـ ثاني تحليل بطريقة كربونات البوتاسيوم ، يجرى كما سبق في خطوة (٢) لكن بإحلال الكربونات ٥٠٪ محل البوتاسا الكاوية ٢٥٪ .

٤ ـ وقع تركيزات النيتروجين الأميني بالمليجرام للمحاليل القياسية على محور سيني ، وعلى المحور الصادي قيم الامتصاص على ٤١٠ نانومتر بطريقتي الاستخلاص (بوتاسا كاوية ، كربونات بوتاسيوم) .

٥ ـ احسب القيم التالية :

$$K_1 = \frac{R - S}{A/B - C/D} \quad (1)$$

و

$$K_2 = S - \frac{C \times K_1}{D} \quad (2)$$

حيث K_1 = مجم أزوت ثاني ميثيل أمين في الأنبوبة ، K_2 = مجم أزوت ثالث ميثيل أمين في الأنبوبة ، R = قيمة الأمين (مجم) من منحنى قياسي ثالث ميثيل أمين بطريقة الكربونات والمتحصل عليها عند امتصاص مساو للعينة بطريقة الكربونات ، S = قيمة الأمين (مجم) من منحنى ثالث ميثيل أمين القياسي بطريقة البوتاسا الكاوية والمقابلة لامتصاص العينة بطريقة البوتاسا الكاوية ، A = الامتصاص من منحنى ثاني ميثيل أمين القياسي بطريقة الكربونات عند ٠,٠١ مجم نيتروچين أميني ، B = الامتصاص من المنحنى القياسي لثالث ميثيل أمين بطريقة الكربونات عند ٠,٠١ مجم نيتروچين أميني ، C = الامتصاص من المنحنى القياسي لثاني ميثيل أمين بطريقة البوتاسا الكاوية عند ٠,٠١ مجم نيتروچين أميني ، D = الامتصاص من المنحنى القياسي لثالث ميثيل أمين بطريقة البوتاسا الكاوية عند ٠,٠١ مجم نيتروچين أميني .

٦ ـ احسب التركيز النهائي لكلا الأمينين مجم / ١٠٠ جم سمك :

$$DMA - N = \frac{K_1 \times [\, V_1 + (0.01 \times M \times W)\,]}{V_2 \times W} \times 100$$

$$TMA - N = \frac{K_2 \times [\, V_1 + (0.01 \times M \times W)\,]}{V_2 \times W} \times 100$$

حيث إن K_1 = مجم أزوت ثاني ميثيل أمين المتحصل عليه من معادلة (1)

K_2 = مجم أزوت ثالث ميثيل أمين المتحصل عليه من معادلة (2)

M = محتوى الرطوبة (٪) في عينة السمك

V_1 = حجم ثالث كلورو الخليك (مل) المستخدم للاستخلاص

V_2 = حجم (مل) المستخلص الموضوع في الأنبوبة للتقدير

W = وزن العينة المستخلصة من الأول (جم) .

١١ ـ دلائل جودة السمك غير المرتبطة بالدهن :

أ ـ أزوت البروتين القابل للاستخلاص :

تعتبر ذائبية البروتين في المحاليل الملحية مقياساً في تصنيف البروتين والحكم على التغييرات البروتينية الراجعة للدنترة أثناء التخزين بالتجميد والتي تؤثر على قوام السمك بعد الطبخ ، فانخفاض البروتين المستخلص بالملح أثناء التخزين بالتجميد يعكس زيادة صلابة السمك بعد الطبخ ، وهذا راجع للفورمالدهيد الناتج من التغييرات الإنزيمية (أثناء التخزين

بالتجميد) في أكسيد ثلاثي ميثيل أمين .

ويمكن إذابة البروتين الخلوي في محلول ٥ ٪ كلوريد صوديوم منظماً بمحلول ٠,٠٠٣ مولربيكربونات صوديوم على ٥ْم ، ثم يقدر البروتين في المستخلص بطريقة البيوريت؛ لذلك تقطع العينة (٢٢جم) بدون إذابة (وهي مجمدة) بسكين حاد إلى مكعبات صغيرة وتضرب في خلاط مع ٤٣٠ مل محلول استخلاص (٠,٢٥٢ جم بيكربونات صوديوم + ٥٠ جم كلوريد صوديوم في لتر ماء في ثلاجة ثم في فريزر حتى تظهر بلورات الثلج ويستخدم في هذه الصورة) مع حفظ وعاء الخلاط في ثلج ليبرد قبل بداية التحليل ، اخلط دقيقتين ونصف . وانقل للطرد المركزي ٣٠ دقيقة بسرعة ١٣ ألف لفة / دقيقة . قدر البروتين في الحال أو تخزن في ثلاجة لمدة يوم أو بالتجميد (-٣٠ْم) حتى التحليل . وعبر عن البروتين المستخلص بالملح Salt Extractable Protein كنسبة مئوية للبروتين أو جم بروتين مستخلص / ١٠٠ جم عينة عضلات سمك .

ب ــ ثانى ميثيل أمين :

يوجد هذا المركب في نفس الوقت مع الفورمالدهيد تحت ظروف التخزين بالتجميد (بأقصى تكوين على حوالي - ١٠ْم) في الأسماك وذلك يرتبط بنقص أكسيد ثالث ميثيل أمين (الذي يتحلل إنزيمياً إلى ثاني ميثيل أمين وفورمالدهيد) . ويقدر ثاني ميثيل أمين (مع ثالث ميثيل أمين) باختبار حمض البيكريك واستخدام البوتاسا الكاوية وكربونات البوتاسيوم ، كما يقدر كذلك باستخدام أجهزة الكروماتوجرافي الغازي والسائل عالي الأداء (مع ثالث ميثيل الأمين والأمونيا معاً) . ويعد اختبار ثاني ميثيل أمين دليلاً غير مباشر لجودة قوام السمك ، إذ يتكون ثاني ميثيل أمين والفورمالدهيد بكميات متساوية مولاريا . وللتقدير يجرى التالي :

١ ـ استخلص ٥٠ جم عينة في ١٠ مل حمض ثلاثي كلورو خليك ٧,٥٪ في خلاط، اطرد مركزياً على ٤ْم ١٥ دقيقة بسرعة ٤٠٠٠ لفة / دقيقة (أو رشح) ، اسحب الرائق للتحليل (أو التجميد على -٢٠ْم لحين التحليل) .

٢ ـ اسحب ١ - ٤ مل مستخلصاً في أنبوبة بغطاء وأكمل بالماء المقطر حتى ١٠ مل (بلانك ١٠ مل ماء مقطراً) + ١ مل دليلاً أمونيا / نحاس (٢٠ جم خلات أمونيوم + ٠,٢ جم كبريتات نحاس في ٣٠ مل ماء ، ١٠ جم صودا كاوية في ٢٥ مل ماء ، أضف الخلات إلى الصودا ، أضف ٢٠ مل نشادر مركزاً ، أكمل إلى ١٠٠ مل بالماء) اخلط ، ثم أضف ١٢ مل ثاني كبريتيد الكربون (٢٥ مل وتكمل بالبنزين إلى نصف لتر) ، وسخن في حمام مائي ٥ دقائق على ٣٧ - ٤٠ْم . أغلق الغطاء واخلط الأنابيب ٥ دقائق . أضف في الحال ١ مل حمض خليك ٣٠٪ (١٥٠ مل حمض خليك ثلجي مع ماء

مقطر حتى ٥٠٠ مل) واخلط دقيقة (إذا بردت الأنابيب فتدفأ قبل وضع الحامض) . اسحب طبقة البنزين العليا إلى أنبوبة أخرى وجففها بإضافة كبريتات صوديوم لامائية ، اقرأ الامتصاص الضوئي على ٤٤٠م .

٣ ـ اجر نفس الخطوات على محاليل قياسية من ثاني ميثيل أمين تحتوي ٢، ٤، ٦، ٨، ١٠ ، ١٤ ميكروجرام لعمل منحنى قياسي يستخلص منه أزوت ثاني ميثيل أمين العينات لحساب تركيزه بالمليجرام أزوت ثاني ميثيل أمين / ١٠٠ جم سمك =

كمية ثاني ميثيل أمين في الأنبوبة من المنحنى بالميكروجرام × حجم المستخلص الكلي (مل) × ١٠٠
―――――――――――――――――――――――――――――――
حجم (مل) المستخلص المضاف للأنبوبة × وزن عينة السمك المستخلصة × ١٠٠٠ .

جـ ـ الفورمالدهيد :

ينتج الفورمالدهيد وثاني ميثيل أمين بكميات مولارية متساوية بحفظ الأسماك البحرية على حرارة أعلى من -٢٥م ، فيسبب الفورمالدهيد صلابة العضلات وانخفاض البروتين المستخلص بالمحلول الملحي وفقد عام للجودة الحسية للسمك البحري المخزن بالتحميد . ويزيد معدل تراكم الفورمالدهيد في السمك المفروم عنه في الشرائح المتماسكة ، وأعلى في العضلات الداكنة والأحشاء عن العضلات البيضاء .

والفورمالدهيد المقدر هو الصورة الحرة غير المرتبطة ؛ لذلك فالمكتشف لا يتعدى ٥٠٪ من الموجود ، إذ للفورمالدهيد القدرة على التداخل مع الأمينات والأحماض الأمينية والمجاميع النشطة في البروتين . وللتقدير تجرى الخطوات التالية :

١ ـ اخلط ١٠٠ جم عينة مجنسة مع ٢٠٠ مل بيركلوريك ٦٪ (أو حمض ثلاثي كلورو خليك) . رشح واجمع ٥٠ مل تحفظ بالتجميد (-٣٠م) لحين التحليل .

٢ ـ عادل المستخلص (٥٠ مل) بالتنقيط بالبوتاسا الكاوية ٣٠٪ إلى PH ٧ وسجل حجم البوتاس المستخدم .

٣ ـ اسحب ١ - ٥ مل مستخلصاً متعادلاً في أنبوبة وخففه إلى ٥ مل بالماء ،ثم أضف ٥ مل دليل ناش (٢ مل أسيتيل أسيتون مع ٧٥ - ٨٠ مل ماء ورج ، أذب ١٥٠ جم خلات أمونيوم في ٣٠٠ مل ماء ، أضف المحلولين معا وأكمل إلى ٥٠٠ مل ، ويحضر يومياً طازجاً ويحفظ في ثلاجة) اخلط ، وسخن ١٠ دقائق في حمام مائي على ٦٠م . برد ٥ دقائق بالماء ، اقرأ الامتصاص الضوئي على ٤١٥ نانومتر .

٤ ـ اعمل منحنىً قياسياً بمحاليل تحتوي على صفر ، ٠,٢ ، ٠,٤ ، ٠,٦ ، ٠,٨ ، ميكرو مول فورمالدهيد (محلول ١ مولر بإذابة ١٢, ٨ جم وزن / وزن محلول فورمالدهيد ٣٧٪ في ماء وأكمل إلى ١٠٠ مل) بأخذ صفر ، ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ مل من المحلول

القياسي ويجرى عليه خطوة (٣) .

٥ ـ احسب تركيز الفورمالدهيد بالميكرومول / جم سمك =

$$\frac{\text{التركيز من المنحنى القياسي} \times ٢٠٠ \times (\text{حجم البوتاس} + ٥٠)}{\text{حجم المستخلص في الأنبوبة} \times ١٠٠ \times ٥٠}$$

أو بالميكروجرام / جم سمك بضرب القيمة ميكرومول / جم × الوزن الجزيئي الجرامي للفورمالدهيد (٣٠) .

***

ولمزيد من الإيضاح يمكن الاستعانة بالمراجع الآتية :

– ديورانت د. ب. ج : كيمياء عضوية ـ جزء أول طبعة أولى ١٩٥٠ (ترجمة المجلس الأعلى للعلوم ١٩٦١) .

– عبد القادر راشد أبو عقادة ، مصطفى محمد أبو النجا (١٩٧٠) : طرق التحليل الغذائي – دار المعارف بالأسكندرية .

ـ فتحى أحمد عبد الحافظ (١٩٦٦) : الكيمياء التحليلية الكمية – دار الهنا للطباعة .

ـ مصطفى صفوت محمد (وآخرون) :كيمياء وتحليل الأغذية ـ دار المعارف بالأسكندرية (١٩٦٣) .

ـ محمد عبد المنعم كمال ، سعد إبراهيم الحناوى (١٩٦٩) : الكيمياء الحيوية العملية ـ المطبعة الفنية الحديثة ـ القاهرة .

ـ مصطفى مرسى (وآخرون) : أساسيات البحوث الزراعية ـ مكتبة الأنجلو المصرية (١٩٦٨) .

- Close , W. & Menke, K. H. (1986) Selected topics in animal nutrilion . Deutschestiftung für Interenationale Entwicklung, Feldafing, Germany .

- Conway, E. J. & O'Malley , E. (1942) Biochem. J., 36:655 .

- De Baaij, J. A. et al. (1986) Sci. Tools. 33 : 17 .

- Doumas, B. T. & Biggs, H. G. (1972) Standard Methods of Clinical Chemistry, vol. 7 , Academic Press, N.Y.

- Doumas , B. T. et al (1981) Clin. Chem., 27 : 1642 .

- Egan, H. et al. (1981) pearson's Chemical Analysis of Foods . 8th Ed . Churchill, London .

- Elmer, H. M. (1978) Standard methods for the examinathion of dairy products. 14th Ed. American public Health Association, Washington Dc .

- Greweling, T. et al (1964) Agric . Food Chem. 12 : 139.

- Gruenwedel, D. W. & Whitaker, J. R. (1985) . Food Analysis . Vol. 3 . Marcel Dekker, N. Y .

- Husdan , H. et al. (1968) Clin. Chem. 14 : 222 .

- Jakobson , P. E. et al. (1960) 322 bertning fraforgs labortoriet, udgivet of stants . Husdgr bugsud valg - kobenhavn .

- Knobloch, E. & Cerna - Heyrovska, J. (1979) Fodder Biofactors, their methods of determination . Academia , Praha .

- Kuhl , J. (1980) Landtechnik, 30 : 160 .

- Lees, R. (1975) Food Analysis. 3 rd Ed. Leonard Hill Books, London .

- Leitegeb, R. (1979) Futtermittelkunde, Vorlesungen, Univ. F. Boku., Wien.

- Lowry, O. H. et al . (1951) Biochem. J., 193 : 265 .

- Merck, E. (1974) Klinisches Labor . 12 . Auflage, Merck, Darmstadt

- Merck, E. (1976) Labordiagnostik in der Tiermedizin. Merck, Darmstadt .

- Merck , E. (1980) Arbeitsanleitungen für die klinische Chemie . Diagnostica Merck , Darmstadt .

- Meyer, H. et al (1980) Supplemente zu vorlersungen and Ubungen in der Tiernahrung . 5 . Auflage, Sprungmann Verlag, Hannover .

- Noel, R. J. (1976) J. AOAC, 59 : 141 .

- Noll, J. S . et al . (1974) Am. Assac. cereal cheists, 51 : 610. oser, P. L. (1979) . et al. Hawk's physiological chemistry . 14 th Ed . Tata Mc Graw - Hill , New Delhi .

- Ranganna, S. (1979) Manual of analysis of fruit and vegetable products . Tata Mc Graw - Hill, New Delhi .

- Rowland, S. T. (1938) J. Dairy Res., 9:42 .

- Schmidl, M. (1981) Laboruntersuchungen - Veterinmedizin. Boehringer, Mannheim .

- Simmonds , D. H. et al . (1976) Chem . Absts. Vol. 84, No. 1 84 : 3486 h.

- Soliman, M. K. & Abd El Moty , I . (1976) A Moderm Approach to Veterinary Clinical & Laboratory Diagnosis . The Scientific Book Centre, Cairo .

- The Feeding stuffs (sampling and Analysis) Regulations 1982 . Agriculture 1982 No . 1144 . Her Majesty's stationery Office, London .

- Thiemann , K. G. (1983) Arch. Tierernähr. 33 : 95 .

- Varley . H. (1978) Pratical Clinical Biochemistry . 4 th Ed. Arnold-Heinemann. India .

- Vertregt, N. (1977) Neth. J. Agric. Sci., 25 : 243 .

- Wells, B.B. (1962) Clinical Pathology . 3 rd Ed., Saunders, Philadelphia & London .

- Wootton , I. O. P. (1974) Microanalysis in Medical Biochemistry, 5 Th Ed., Churchill, Londo

الفصل الرابع
الكربوهيدرات

وتشمل الألياف الخام Crude Fiber ، والمستخلص الخالي من النيتروجي Nitro- (NFE) gen Free Extract أي الكربوهيدرات الذائبة ، ونظراً لأن التقسيم الغذائي المتبع منذ قرن وربع في التحليل يعتبر أن الألياف الخام هي كل ما لا يهضم بالغليان لمدة نصف ساعة في حامض الكبريتيك ١,٢٥ ٪ ثم في الصودا الكاوية ١,٢٥ ٪ ، وأن الكربوهيدرات الذائبة NFE هي المواد التي تذوب إذا عوملت العينة بالحامض والقلوي المخففين ، ونظراً لأن هذا التقسيم عديم المعني من الناحية الكيماوية ، وغير دقيق بتاتاً من الناحية الغذائية الفسيولوجية ، إذ لا يوجد مركب يسمى بالألياف لكنها مجموعة مواد تشمل السليولوز والهيميسليلوز واللجنين ، كما أن الكربوهيدرات الذائبة تحتوي على النشا والمواد السكرية الذائبة كالسكريات البسيطة ، فهناك خطأ كيماوي ناتج من احتواء الألياف الخام هذه على بعض الكربوهيدرات الذائبة المفروض وجودها في NFE ، كما أن الأخير يحتوي على جزء من الألياف الخام المقدرة بالطريقة التقليدية القديمة ، فقد يحتوي المستخلص الخالي من النيتروجين على نشويات وسكريات وبنتوزانات ، كذلك على سليلوز ولجنين بنسب متفاوتة.

وتقدر الكربوهيدرات الذائبة أو المستخلص الخالي من النيتروجين بطرح النسب المئوية لتقديرات الرطوبة ، والرماد ، والبروتين ، والمستخلص الإيثيري ، والألياف الخام من مائة . وفيها تتحمل هذه النسبة كل الأخطاء الواقعة في التقديرات الأخرى ؛ لذا تقدر الكربوهيدرات الذائبة الكلية كيماوياً بتحللها إلى سكريات بسيطة ثم تقدير هذه السكريات البسيطة الكلية بإحدى الطرق الواردة فيما يلي .

كما ينصح بتقدير الألياف بالطرق الحديثة التالي الحديث عنها سواء بتقدير كل من السليلوز ، والهيميسيليلوز ، واللجنين كل على حدة ، أو باستخدام طريقة المنظفات Deter- gents الواردة فيما بعد .

١ ـ الألياف الخام :

وتقدر الألياف الخام بالطريقة القديمة في العينات الجافة المنزوعة الدهن لسهولة الترشيح، وذلك بغليان وزن معلوم من العينة (٢ جم) مع ٢٠٠ مل H_2SO_4 ١,٢٥ ٪ يغلي، ليبدأ الغليان بعد أقل من دقيقة مع وضع مكثف عاكس للمحافظة على تركيز

الحامض لمدة نصف ساعة ، يعقبها ترشيح على حرير طبيعي أو تيل أو ورق ترشيح مناسب مع تكرار الغسيل لزوال الحموضة ، ثم تنقل رواسب العينة كمياً إلى نفس الكأس أو الدورق ليهضم مع ٢٠٠ مل NaOH ١,٢٥ ٪ يغلي ، ليبدأ الغليان في أقل من دقيقة ولمدة نصف ساعة ، أسفل مكثف عاكس ، والترشيح كما سبق ، والغسيل بالماء والكحول الإيثيلي والإيثير البترولي ، والنقل الكمي لبوتقة ثم التجفيف للرواسب (الألياف والرماد) بالبوتقة لمدة ساعتين على ١٣٥م ، والتبريد والوزن ثم الحرق على ٦٠٠م لمدة ساعتين ، والتبريد والوزن ، والفرق بين الوزنتين هو وزن الألياف الخام . ويجب ألا يتعدى الفرق بين مكررتي التقدير عن ٣ ٪ من متوسطهما .

وقد سميت الكربوهيدرات Carbohydrates هكذا لوجود الهيدروچين والأوكسچين بها بنسبة تواجدهما في الماء . والكربوهيدرات عبارة عن الدهيدات ، أو كيتونات عديدة الهيدروكسيل ، وتقسم إلى سكريات أحادية ، وبسيطة ، وعديدة التسكر .

ورغم أنه في معظم الأحوال يتم تقدير الكربوهيدرات الذائبة في المستخلص الخالي من النيتروچين NFE بطريقة الفرق ، إلا أنه قد نحتاج لتقدير كمي للنشا ، أو للسكريات المختزلة (جلوكوز) ، أو غير المختزلة (سكروز) بالإضافة للتقدير الكمي للسليلوز والهيميسيليلوز وغيرها .

٢ ـ الجلوكوز :

يؤدي وجود مجموعة الدهيدية أو كيتونية حرة في تركيب السكريات المختزلة مثل الجلوكوز إلى اختزال هيدروكسيدات بعض المعادن كالنحاس والزئبق والفضة ، فإضافة محلول كبريتات النحاس إلى هيدروكسيد الصوديوم يتكون هيدروكسيد نحاسيك .

$$Cu\,SO_4 + 2\,Na\,OH \longrightarrow Cu\,(OH)_2 + Na_2\,SO_4$$

وبتسخين هيدروكسيد النحاسيك المتكون يعطي لوناً راسباً أصفر من أكسيد النحاسوز (بالاختزال لوجود السكريات المختزلة) .

فيحضر محلول فهلنج كالآتي :

فهلنج أ : ٣٤,٦٥ جم كبريتات نحاس متبلورة تذاب في ماء ويكمل إلى ٥٠٠ مل .

فهلنج ب : ٨٢,٥ جم هيدروكسيد بوتاسيوم + ١٧٣ جم طرطرات صوديوم وبوتاسيوم (ملح روشيل) تذاب في ماء ويكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل .

ثم يجرى التقدير بأحد طريقتين :

أ ـ يغلي حجم معين من المحلول السكري (العينة) مع كمية زائدة من فهلنج تكفي

لأن تختزل بالسكريات الموجودة بالعينة وزيادة ، بحيث يبقى المحلول أزرق اللون ثم يرشح المحلول ويجفف الراسب الأصفر (Cu_2O) ويوزن ، ومن وزنه يمكن حساب كمية الجلوكوز في المحلول من جداول خاصة (Munson & Walker) .

ب ـ ينقط المحلول السكري من سحاحة على حجم معلوم من فهلنج ، وتغلي حتى تمام الاختزال بزوال اللون الأزرق ، ومنه يمكن حساب كمية الجلوكوز في المحلول ، ويتم ذلك كالآتي :

١ـ املأ سحاحة بالمحلول السكري المخفف ، وثبتها فوق جفنة موضوعة على لهب بنزن.

٢ـ ضع في الجفنة ٥ مل محلول فهلنج أ + ٥ مل محلول فهلنج ب ، وسخن للغليان على لهب منتظم .

٣ـ نقط المحلول السكري من السحاحة على فهلنج وهو يغلي تدريجياً ، فتقل زرقة المحلول تدريجياً حتى يختفي اللون الأزرق تماماً .

ملاحظات :

أ ـ لون أكسيد النحاسوز يكون برتقاليا ، أو أصفر ، أو أحمر حسب حجم جزيئات الراسب ، فكلما كانت صغيرة ودقيقة كان لون الراسب أصفر ، أما إذا كانت الجزيئات للراسب كبيرة كان لونه محمرا .

ب ـ حافظ على ثبات حجم المحلول بالجفنة ، بأن تتعادل كمية المحلول السكري المضافة مع الماء المفقود من محلول فهلنج في الجفنة أثناء الغليان .

جـ ـ لا تقلب حتى لا يفقد جزء من هيدروكسيد النحاسيك على المحرك أو على جوانب الجفنة .

د ـ عدم شدة الغليان لمنع تناثر جزء من محلول فهلنج .

هـ ـ إذا اضطر لإضافة ماء مقطر فيغلي أولاً لطرد الأوكسجين الذي يؤدي وجوده لوقف الاختزال لهيدروكسيد النحاسيك .

و ـ إذا انقطع الغليان أثناء العمل فلا يمكن مواصلة التقدير بل يعاد .

ز ـ تجرى معايرة لنفس الحجم من محلول فهلنج بواسطة محلول سكري قياسي معلوم التركيز لاستنتاج كمية الجلوكوز المعادلة أو المختزلة للحجم المعلوم من فهلنج ومنه يستنتج كمية الجلوكوز بالعينة .

٣ ـ السكريات المختزلة وغير المختزلة :

إذا أريد تقدير ذلك فتقدر أولاً السكريات المختزلة في صورة جلوكوز كما سبق ، ثم

يؤخذ حجم آخر من مستخلص العينة ، وتحلل مائيا لتحويل السكريات غير المختزلة كالسكروز إلى مختزلة ، وبتقدير هذه السكريات المختزلة الكلية كما سبق في تقدير الجلوكوز وبالطرح يقدر كمية كل من السكريات المختزلة والسكريات غير المختزلة .

وللتحليل المائى لتحويل السكريات غير المختزلة إلى مختزلة يجرى التالي :

٢٥ مل محلول عينة في دورق مخروطي سعة ٢٥٠ مل + ٥ مل حامض كبريتيك مخففا وسخن للغليان ، ثم انقل الدورق إلى حمام مائي على درجة حرارة ٦٠°م لمدة نصف ساعة ، ثم برد الدورق وعادل الحموضة بالصودا الكاوية في وجود دليل أحمر الفينول ، ثم قدر السكريات المختزلة الكلية .

جدول تحويل راسب أكسيد النحاس إلى سكر محول :

أكسيد نحاس مجم	سكر محول مجم	أكسيد نحاس مجم	سكر محول مجم
٢٠	٨,٣	٢٠٠,١	٨٤,٧
٣٠	١٢,٤	٢١٠,١	٨٨,٥
٤٠	١٦,٥	٢٢٠,١	٩٢,٨
٥٠	٢٠,٧	٢٣٠,١	٩٧,١
٦٠	٢٤,٩	٢٤٠,١	١٠١,٦
٧٠	٢٩,٠	٢٦٠,١	١١٠,٦
٨٠	٣٣,١	٢٧٠,٢	١١٥,٢
٩٠	٣٧,٣	٢٨٠,٢	١١٩,٧
١٠٠,١	٤١,٦	٢٩٠,٢	١٢٤,٢
١١٠,١	٤٥,٨	٣٠٠,٢	١٢٨,٨
١٢٠,١	٤٩,٩	٣١٠,٢	١٣٣,٣
١٣٠,١	٥٤,٢	٣٢٠,٢	١٣٧,٩
١٤٠,١	٥٨,٥	٣٥٠,٢	١٥١,٧
١٥٠,١	٦٢,٧	٤٠٠,٢	١٧٥,٤
١٦٠,١	٦٧,٠	٤٥٠,٣	١٩٩,٦
١٧٠,١	٧١,٢	٥٠٠,٣	٢٢٤,٧
١٨٠,١	٧٥,٥	٥٠٧,٠	٢٢٨,٤
١٩٠,١	٧٩,٩	٥١١,٤	٢٣١,٠

ولتقدير السكر المختزل يجرى التقدير في مستخلص العينة وهو مستخلص مائي أو كحولي.

المستخلص المائي :

وزنة معلومة مطحونة في كأس تغلي مع ٢٠٠ مل ماء + ٢ جم كربونات كالسيوم لمدة ١/٢ ساعة . برد وانقل إلى دورق معياري مع محلول ١٠ ٪ خلات رصاص حتى يشاهد ترسيب راسب حبيبي في القاع ، فيكمل بالماء للعلامة ويرشح مع إضافة مزيد من أكسالات البوتاسيوم .

المستخلص الكحولي :

تستخلص عينة معلومة الوزن في جهاز سوكسلت لمدة ٦ ساعات بالكحول ٨٠٪ (محتويات الكستبان توجه لتقدير النشا) ، المستخلص في القابلة يؤخذ ويبخر حتى يبقى ١٠ مل ويبرد ويروق بمحلول خلات رصاص مشبع ، ثم إضافة محلول مشبع من فوسفات ثنائي الصوديوم ، ثم كمية مسحوق فحم ويخلط ويرشح على مسحوق الطلق وينقل كمياً إلى دورق معياري .

هذا وتتعدد طرق تقدير الجلوكوز على أساس اختزاله لهيدروكسيد النحاسيك كما في محلول فهلنج (كما سبق) ، أو في محلول بندكت (كبريتات نحاس ، كربونات صوديوم ، ثيوسيانات بوتاسيوم ، سترات صوديوم ، حديد وسيانيد بوتاسيوم) ، أو بواسطة التقدير اليودي باستخدام محلول الثيوكبريتات صوديوم التي تعادل اليود ، وبمعلومية حجم الثيوكبريتات المستخدم في المعايرة تستخرج كمية الجلوكوز من جداول خاصة (Schorl) .

ولتقدير السكريات الكلية يتم ذلك في مستخلص عينة محللة مائية بالحامض لتحويل كل السكريات إلى سكريات بسيطة يسهل تقديرها .

وحديثاً أصبح فصل السكريات الذائبة وتحديد نوعها وكميتها على الكروماتوجرافي الورقي وكذلك على الكروماتوجرافي رقيق الطبقات TLC من السهولة والدقة بمكان .

٤ ـ الكربوهيدرات الذائبة الكلية :

يتم ذلك كيماويا بتحويل الكربوهيدرات الذائبة إلى سكريات بسيطة ، يجرى تقديرها ضوئيا بعد ذلك .

ولتحويل الكربوهيدرات الذائبة إلى سكريات بسيطة يجري التالي :

١ ـ توزن كمية معلومة من مسحوق المادة الغذائية (٠,٢٥ - ١,٠ جم) في أنبوبة اختبار ، ثم يضاف إليها ٢٥ مل ماء مقطراً + ٢٥ مل حامض هيدروكلوريك (٢ عياري) وتخلط جيداً .

٢ ـ توضع الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة ٩٥ْم لمدة ٣ ساعات مع الرج المستمر ، مع إضافة ماء مقطر إلى الأنابيب إذا انخفض حجم المحلول عن ٥٠ مل .

٣ ـ تبرد الأنابيب ، ثم تنقل محتوياتها كميا إلى دورق معياري سعة ٢٥٠ مل باستخدام الماء المقطر ، ثم يضاف ١٠ مل من محلول كبريتات زنك (١٠٪) + ٣ نقط دليل فينولفثالين (١٪ في كحول إيثيل ٧٠٪) ، وترج محتويات الدوارق .

٤ ـ يضاف إلى محتويات الدوارق محلول صودا كاوية (٠,٥ عياري) إلى أن يبدأ ظهور راسب هيدروكسيد الزنك ، ثم يضاف ببطء وبحرص الصودا الكاوية حتى يتحول لون محتويات الدوارق إلى اللون الوردي .

٥ ـ يضاف حامض كبريتيك (٠,٥ عياري) بالتنقيط حتى تصبح محتويات الدوارق عديمة اللون ، ثم تخفف بالماء المقطر حتى العلامة .

٦ ـ تترك الدوارق بمحتوياتها ١٠ دقائق مع الرج المستمر ، ثم ترشح محتوياتها ويحتفظ بالراشح لحين تقدير الجلوكوز .

ويقدر الجلوكوز بطريقة الأنثرون Anthrone Reagent كالتالي :

١ ـ يضاف ١٠ مل من محلول الأنثرون (١ جم في لتر من حامض الكبريتيك (٧٦٠ مل حامض كبريتيك مركزاً نقيا على ٢٤٠ مل ماء مقطراً) يحضر يوميا أو مرة كل أسبوع على الأكثر) إلى أنبوبة زجاجية سعة ٢٥ مل ، ثم توضع الأنبوبة في حمام ثلجي .

٢ ـ ينقل ١ مل من الراشح (سابق التحضير لتحويل الكربوهيدرات الذائبة إلى سكريات بسيطة ذائبة) إلى الأنبوبة بحيث يلامس طرف الماصة جدار الأنبوبة وينزل السائل مكوناً طبقة رقيقة على سطح محلول الأنثرون .

٣ ـ تحرك الأنبوبة حركة دورانية لتقليب محتوياتها ، ثم توضع في حمام مائي يغلي لمدة ١٠ دقائق .

٤ ـ تبرد محتويات الأنبوبة إلى درجة حرارة الغرفة ، ثم تقرأ كثافة لون المحلول على سبكترو فوتومتر على طول موجة ٦٢٠ ملليميكرون .

٥ ـ تجرى نفس الخطوات السابقة على ١ مل من محلول جلوكوز قياسي (تركيزه ١٠٠ ميكروجرام / مل أي ٠,٠١٪) .

٦ ـ كمية الجلوكوز الموجودة في ١ مل من راشح الكربوهيدرات =

$$\frac{\text{قراءة راشح الكربوهيدرات}}{\text{قراءة المحلول القياسي للجلوكوز}} \times ٠,١ \text{ ملليجرام .}$$

٧ ـ كمية الكربوهيدرات الذائبة في عينة المادة الغذائية (سكريات كلية كسكروز) = كمية الجلوكوز في ١ مل راشح كربوهيدرات × كمية الراشح الكربوهيدراتي الناتج من العينة × ٠,٩٥ .

٥ ـ السكريات الذائبة :

يقصد بها المواد السكرية غير النشوية ، وتقدر كيمائيا باستخلاصها أولاً ، ثم تقديرها لونيا بطريقة الأنثرون سابقة الذكر . ولاستخلاصها يجرى الآتي :

١ ـ يوزن ٠,٥ جم من مسحوق المادة الغذائية وتوضع في دورق معياري سعة ١٠٠مل.

٢ ـ يضاف إلى الدورق ١ جم كلوريد صوديوم + ٢٠ مل كحول إيثيل نقي .

٣ ـ يترك الدورق بمحتوياته ١٠ دقائق مع الرج المستمر لاستخلاص المواد الدهنية .

٤ ـ يضاف ماء مقطر حتى يصل حجم المحلول إلى ٩٠ مل ويغمر الدورق في حمام مائي على درجة حرارة ٢٠ْم لمدة ٩٠ دقيقة مع الرج المستمر .

٥ ـ ترشح محتويات الدورق (يمكن تركيزه بالغليان على موقد كهربائي حتى يمكن التخلص من الكحول) ، ويمكن التخلص من لون راشح العينات الخضراء بتمريره في عمود (١× ١٠ سم) من أكسيد الماغنسيوم قبل التخلص من الكحول بالغليان ، ثم يجرى التخلص من الكحول بعد التخلص من المواد الملونة ، ويكون المستخلص جاهزاً لتقدير السكريات بالطريقة اللونية .

٦ ـ النشا :

الراسب المتبقي من خطوة رقم (٥) في تقدير السكريات الذائبة يمكن أخذه لتقدير النشا فيه (أو نبدأ من أول خطوة كما سبق في تقدير السكريات الذائبة للحصول على الراسب من خطوة رقم (٥)) بإجراء الآتي :

١ ـ غسيل الراسب عدة مرات بمخلوط الكحول مع كلوريد الصوديوم (١٠ جم كلوريد صوديوم في ٢٠٠ مل كحول إيثيل ، ويكمل بالماء المقطر إلى لتر) ١٥٠ مل .

٢ ـ ينقل الراسب إلى أنبوبة اختبار بالماء المقطر (٢٥ مل) ثم يضاف إلى الأنبوبة ٢٥ مل حامض هيدروكلوريك (٢ عياري) ، وتخلط محتوياتها جيداً .

٣ ـ توضع الأنبوبة في حمام مائي على درجة حرارة ٩٥ْم لمدة ٣ ساعات مع الرج المستمر .

٤ ـ تبرد محتويات الأنبوبة ، وتنقل كميا بالماء المقطر إلى دورق معياري ٢٥٠ مل ، ثم يضاف ١٠ مل محلول كبريتات زنك (١٠٪) مع ٣ نقط من دليل فينولفثالين .

٥ ـ تضاف صودا كاوية (٠,٥ عياري) حتى يتحول اللون إلى الوردي ، ثم يضاف حامض كبريتيك (٠,٥ عياري) بالتنقيط حتى يزول اللون ، ويكمل الحجم إلى العلامة.

٦ ـ يترك الدورق ١٠ دقائق مع الرج المستمر ، ثم ترشح محتوياته ويقدر فيها الجلوكوز بطريقة الأنثرون .

٧ ـ كمية النشا = كمية الجلوكوز × ٠,٩

ولتقدير النشا في مادة علف تعامل المادة الجافة بالحامض والتسخين للانحلال المائي أولاً حتى يمكن تقدير النشا في صورة جلوكوز كالآتي :

١ ـ زن حوالي ٣ جم بالضبط من مادة العلف ، ثم استخلصها عدة مرات بالإثير ، ثم اغسلها بالكحول ١٠ ٪ ، ثم تغسل بكحول مركز .

٢ ـ انقل مادة العلف بعد ذلك إلى دورق مخروطي بواسطة ٥٠ مل ماء مقطراً ، وسخن لمدة ١٥ دقيقة على حمام مائي مع التقليب المستمر حتى التجانس التام .

٣ ـ أضف إلى الدورق ٢٥ مل من حامض هيدروكلوريك مركز ثم قلب جيداً ، ويترك على حمام مائي إلى أن يتم انحلال كل النشا ، ويمكن التأكد من ذلك بخلط نقطة من المحلول مع نقطة من اليود المذاب في محلول يوديد بوتاسيوم .

٤ ـ يرشح المحلول في دورق معياري سعة ٢٥٠ مل ويغسل المتبقي على ورقة الترشيح عدة مرات ويكمل بالماء المقطر للعلامة .

٥ ـ يقدر الجلوكوز في جزء معلوم من محتويات الدورق المعياري بعد معادلته تماماً بهيدروكسيد صوديوم مركز (٥ عياري) في وجود دليل أحمر الفينول .

٦ ـ يحسب النشا بضرب كمية الجلوكوز × ٠,٩ لاستنتاج كمية النشا التي وجدت قبل عملية الانحلال المائي ثم تحسب نسبتها المئوية في العينة .

ومن المعروف أنه يمكن تقدير السكريات والنشا بعد تحللها بواسطة ظاهرة الاستقطاب الضوئي بأجهزة البولاريمتر أو السكاريمتر .

٧ ـ اللاكتوز :

١ ـ زن عينة حوالي ١ جم بالضبط في دورق سعة ١٠٠ مل ، ثم أضف ٢٥-٣٠ مل ماء وضعها في حمام مائى يغلي ٣٠ دقيقة . برد إلى ٣٥°م تقريباً . أضف ٥ مل معلق خميرة (٢٥ جم خميرة طازجة Saccharomyces Cerevisiae تعلق في ١٠٠ مل ماء وتصلح لمدة أسبوع إذا حفظت في ثلاجة) أو أكثر إذا احتوت العينة أكثر من ٤٠ ٪ سكر قابل للتخمر.

٢ ـ ضع الدورق على ٣٨-٤٠°م لمدة ساعتين . برد حتى ٢٠°م تقريباً ، ثم أضف ٢,٥ مل محلول كاريز رقم ١ (٢١,٩ جم خلات زنك ثنائي الماء تذاب في ماء ، ثم يضاف ٣ مل حمض خليك ثلجي ، ويخفف إلى ١٠٠ مل بالماء) . قلب ٣٠ ثانية ، ثم أضف ٢,٥ مل محلول كاريز رقم ٢ (أذب ١٠,٦ جم حديد وسيانيد بوتاسيوم في ماء وخفف إلى ١٠٠ مل) ، وقلب ثانية لمدة ٣٠ ثانية .

٣ ـ أكمل إلى ١٠٠ مل بالماء ، واخلط ثم رشح ، وانقل بماصة حجماً معلوماً يحتوي ٤٠-٨٠ مجم لاكتوز ، وأكمل بالماء إلى ٢٥ مل في دورق .

٤ ـ أجر تجربة خالية من العينة بنفس الخطوات السابقة .

٥ ـ قدر اللاكتوز بنقل ٢٥ مل محلول لف شورل Luff - Schorl (محلول كبريتات نحاس (٢٥ جم كبريتات نحاس سباعي الماء في ماء وخفف إلى ١٠٠ مل) ، محلول حمض سيتريك (٥٠ جم حمض سيتريك أحادي الماء في ماء وخفف إلى ٥٠ مل) ، محلول كربونات صوديوم (١٤٣,٨ جم كربونات صوديوم لامائية تذاب في ٣٠٠ مل ماء دافىء ، تترك لتبرد ، قلب بحذر ، أضف إليها محلول حمض السيتريك ، ثم أضف إليهما محلول كبريتات النحاس ، وأكمل إلى لتر بالماء . اتركه ليلة ثم رشح)) إلى محتويات الدورق في نهاية خطوة رقم ٣ (العينة) ، ثم أضف عدد ٢ حجر خفاف لمنع الفرقعة . سخن مع التقليب حتى يبدأ الغليان في ظرف دقيقتين ، ثم ضع مكثفاً عاكساً على الدورق ، واغل ١٠ دقائق بالضبط . برد في ماء بارد في الحال ، وبعد ٥ دقائق أضف ١٠ مل يوديد بوتاسيوم (٢٠٪) ، وفي الحال أضف ٢٥ مل حمض كبريتيك (٦ عياري) بحذر . عاير بمحلول ثيوكبريتات صوديوم (٠,١ عياري) حتى يظهر لون أصفر باهت عندئذ أضف دليل النشا (أذب ٥ جم نشا ذائب في ٣٠ مل ماء ، ثم أضف ذلك إلى لتر ماء يغلي ، ثم اغل ٣ دقائق . اتركه يبرد ، ثم أضف ١٠ مجم يوديد زئبقيك كمادة حافظة) وأكمل المعايرة .

٦ ـ أجر معايرة مقارنة على دورق به ١٠ مل محلول يوديد بوتاسيوم مع ٢٥ مل حمض كبريتيك + ٢٥ مل دليل لف شورل + ٢٥ مل ماء ، وعاير كما سبق في العينة لكن بدون غليان .

٧ ـ احسب الفرق بين حجم الثيوكبريتات للمقارنة والعينة بالمليلتر ٠,١ عياري .

ومن الجدول التالي يمكن حساب كمية اللاكتوز في حجم المستخلص المستخدم ، مع الأخذ في الاعتبار التجربة الخاوية ، ويعبر عن النتيجة كنسبة مئوية من العينة .

حجم ثيوكبريتات البوتاسيوم ٠,١ عياري (مــل)	اللاكتوز (مجم)
١	٣,٦
٢	٧,٣
٣	١١,٠
٤	١٤,٧
٥	١٨,٤
٦	٢٢,١
٧	٢٥,٨
٨	٢٩,٥
٩	٣٣,٢
١٠	٣٧,٠
١١	٤٠,٨
١٢	٤٤,٦
١٣	٤٨,٤
١٤	٥٢,٢
١٥	٥٦,٠
١٦	٥٩,٩
١٧	٦٣,٨
١٨	٦٧,٧
١٩	٧١,٧
٢٠	٧٥,٧
٢١	٧٩,٨
٢٢	٨٣,٩
٢٣	٨٨,٠

وفي اللبن المحتوي نسبة طبيعية من الجوامد غير الدهنية Solids - not - fats (SNF) أو non - fatty solids (NFS) أي حوالي ٨,٤–٨,٧٪ فإن نسبة اللاكتوز إلى البروتين إلى الرماد تكون ١٣ : ١٩ : ٢ ، وهذه تعرف بنسبة فيث Vieth ə ratio ، وهي لا تتأثر بإضافة أو نزع الماء ؛ لذلك فهي مفيدة في الكشف عن أي شواذ في اللبن السائل والمكثف والجاف والكريمة .

ويمكن حساب جوامد اللبن غير الدهنية من المكونات التالية :

اللاكتوز $\times \frac{٢٤}{١٣}$

البروتين $\times \frac{٢٤}{٩}$

الرماد $\times \frac{٢٤}{٢}$

٨ ـ التقسيم الحديث للكربوهيدرات :

قد يطلق على السكريات الأحادية Monosaccharides سكريات بسيطة ، كما يطلق على السكريات المحتوية ٢ – ٦ وحدات سكر أحادي بالسكريات البسيطة Oligosaccharides ، أما السكريات العديدة Polysacchrides فتضم تحتها مجاميع عديدة تشمل البنتوزان ودكسترين ونشا وسليلوز وجليكوجين وخلافها من صموغ وهيميسليلوز واللجنين (وإن كان اللجنين فينولي التركيب وليس كربوهيدراتي إلا أنه يقع في هذا التقسيم تحت الكربوهيدرات الخام) .

ونظراً لأهمية الكربوهيدرات (كأكبر جزء من علائق الحيوانات) لأنها تشكل ٧٥٪ من المادة الجافة النباتية ، وكونها مصدر طاقة للحيوان ، فقد اهتم بتقسيمها وتقديرها . فقد طورت طريقة للتحليل الروتيني للكربوهيدرات مستحدثة لتناسب التقسيم الحديث للكربوهيدرات ، وفيما يلي وصفها :

١ ـ تجفد أو تجفف Freeze dried or dried مادة العلف على درجة حرارة ٦٠°م أو أقل ، وتطحن لتمر من منخل نمرة ٢٠ Mesh (أو أنعم) ، مع استخلاص دهن العينات الغنية بالدهن قبل تحليلها .

٢ ـ يوزن ١ جم عينة في أنبوبة طرد مركزي سعة ٥٠ مل ، ويضاف إليها ٢٥ مل كحول إيثايل ٨٠٪ . سخن الأنبوبة على حمام ماء يغلي لمدة ٣٠ دقيقة . برد إلى حرارة الغرفة ، واطرد مركزياً ، واجمع الطبقة الرائقة العليا . أضف ٢٥ مل (إيثانول) أخرى ، وسخن ثم برد واطرد مركزياً ، واجمع الرائق كله معاً في دورق معياري ، وخفف للعلامة، وقدر فيه السكريات الذائبة في صورة جلوكوز بطريقة Phenol - Sulfuric acid على طول

موجة ٤٩٠ نانومتر .

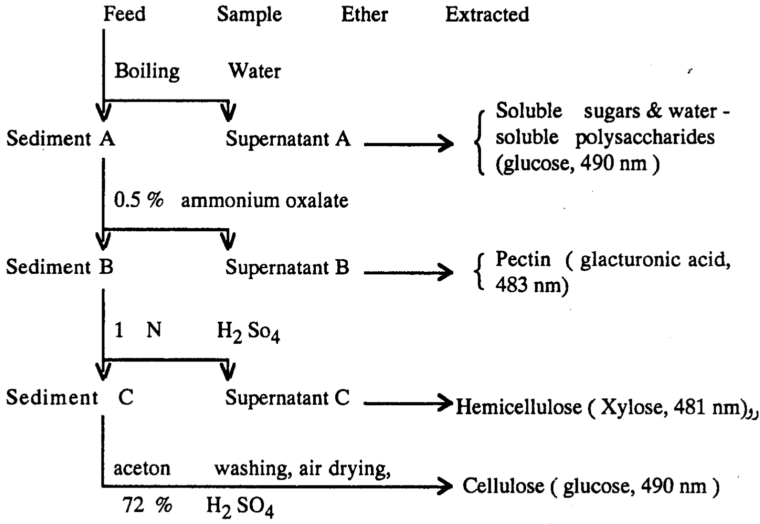
٣ ـ أضف ٢٥ مل ماء مقطراً للراسب في أنبوبة الطرد المركزي ، واغل ١٠ دقائق في حمام مائي. برد واطرد مركزياً ، ثم كرر عملية الاستخلاص بالماء ، واجمع هذه المستخلصات الرائقة ، وخففها في دورق معياري لتقدير السكريات العديدة الذائبة في الماء ، في صورة جلوكوز على طول موجة ٤٩٠ نانومتر .

٤ ـ أضف للراسب ٢٥ مل محلول ٠,٥٪ أكسالات أمونيوم ، وسخن ٣٠ دقيقة على حمام ماء يغلي، وبرد واطرد مركزياً،كرر الاستخلاص بالأكسالات، واجمع الرائق، وخففه في دورق معياري لتقدير البكتين كحمض جالاكتورنيك على طول موجة ٤٨٣ نانومتر .

٥ ـ اخلط الراسب مع ٢٥ مل حمض كبريتيك عياري ، وسخن ٣٠ دقيقة على حمام ماء يغلي ، وبرد واطرد مركزياً ، وكرر الاستخلاص ، ثم اجمع الرائق في دورق معياري لتقدير الهيميسليلوز كزيلوز على طول موجة ٤٨١ نانومتر .

٦ ـ اغسل الراسب بالماء المقطر الساخن عدة مرات ، ثم مرتين بالأسيتون ، واترك أنبوبة الطرد المركزي في فرن تجفيف لمدة ليلة . اصحن الراسب الجاف بساق زجاجية ، ثم أضف ١٠ مل حمض كبريتيك ٧٢٪ (وزن / وزن) ، واترك الأنبوبة على حرارة الغرفة ٤ ساعات . أضف ٤٠ مل ماء مقطراً ، واخلط وسخن لمدة ساعة على حمام ماء يغلي . برد واطرد مركزياً . استخلص الراسب مرة أخرى بمقدار ٢٥ مل ماء مقطراً ، واطرد مركزياً ، واجمع الرائق كله ، وخففه في دورق معياري لتقدير السليلوز كجلوكوز على طول موجة ٤٩٠ نانومتر .

٧ ـ انقل الراسب لقمع ترشيح واغسل ٦ مرات بالماء، ومرتين بالأسيتون. خفف الراسب المغسول ، وزنه ثم رمده وزنه ، ومن الفقد في الوزن استنتج اللجنين غير الذائب في العينة. وإذا كان الوضع لا يحتاج تقدير اللجنين، وكذلك الفرق بين السكريات الذائبة والسكريات العديدة التسكر الذائبة في الماء ، فإن في هذه الحالات يمكن اختصار الخطوات كما في الرسم الإيضاحي التالي :



وذلك اعتماداً على أن محلول Phenol - Sulfuric Acid يتفاعل مع السكريات المختلفة ، معطياً ألواناً عند أقصى امتصاص مميز على أطوال موجات محددة . وكذلك على أن النشا يتحلل إلى جلوكوز ، كما أن السليلوز عبارة عن سلاسل جلوكوز ، والهيميسليلوز يتحلل بالأحماض المخففة إلى سكريات بسيطة (زيلوز)، على عكس السليلوز الذي لا يتأثر إلا قليلاً بالأحماض المخففة، لكن يتأثر بالأحماض المركزة ، بينما اللجنين لا يذوب في الحمض المركز ($72\%\ H_2SO_4$) ؛ لذا يقدر بالترشيح . ونظراً لأن اللجنين مركب عطري فينولي ليس كربوهيدراتي ، كما أن جزءاً منه يذوب في الحامض المركز ، وآخر لا يذوب، أي أن الجزء الذائب يذهب مع الكربوهيدرات الذائبة ، وغير الذائب يذهب مع الألياف الخام في التحليل الروتيني العادي (Weende - Analysis) ، فقد وجد حديثاً فصله على حدة في التحليل الغذائي العام .

٩ ـ السليلوز :

ونظراً لأهمية السليلوز في الأعلاف النباتية لكبر نسبته ، فأصبح من المهم تقديره ومعرفة مدى استفادة الحيوان منه وهضمه له . ويقدر السليلوز بإذابة ما دونه من مركبات عضوية ، ليبقى السليلوز والرماد ، وبالحرق نستنتج وزن السليلوز كالتالي :

١ ـ يوزن حوالي ١ جم بالضبط من العينة وتوضع في أنبوبة غليان ٥٠ مل أو كأس ١٠٠ مل .

٢ ـ يضاف للعينة ١٥ مل مخلوط هضم (حامض خليك ثلجي وحامض نيتريك مركز

بنسبة ١/٥) ويغلي على حمام مائي لمدة ٢٠ دقيقة .

٣ ـ رشح خلال بواتق جوتش ، واغسل الأنابيب عدة مرات بالماء المغلي ، ويضاف للبواتق .

٤ ـ تغسل محتويات البواتق ٣ مرات بماء مغلي ، ثم مرتين بكحول إيثايل ساخن ، ثم مرة ببنزين بارد ، ثم مرتين بكحول ساخن ، ثم مرة بالإيثير البارد .

٥ ـ جفف بواتق جوتش على درجة حرارة ١٠٥ْم لمدة ٥ – ٦ ساعات ، ثم توزن .

٦ ـ تحرق البواتق على ٦٠٠ْم لمدة ساعتين ، وتبرد وتوزن ، والفارق هو وزن السليلوز .

١٠ ـ الهيميسليلوز :

يستخلص الدهن بالمذيبات العضوية ، وينزع اللجنين بكلوريت الصوديوم ، ثم يذاب الهيميسليلوز في ص أ يد ١٠ ٪ ، ويعاد ترسيبه بالكحول ، ويفصل بالترشيح والتجفيف . فتؤخذ وزنة (٤ جم) جافة مطحونة ، وتستخلص بكحول الميثايل ٨٠ ٪ لمدة ساعتين على ٤٠ْم ، ويرشح على بوتقة جوتش ، وتنقل المحتويات إلى كأس به ٨٠ مل مذاب فيها ١,٨٨ كلوريت صوديوم ، ٠,٤ جم حمض خليك ، وتظل ٥ ساعات على ٧٥ – ٨٠ْم ، ثم يرشح ويغسل عدة مرات بالماء المقطر على بواتق جوتش . تنقل المحتويات ثانية إلى كأس به ٤٠ مل ص أ يد ١٠ ٪ لمدة ٤ ساعات على ٢٥ْم مع الرج كل حين ، ويرشح على بواتق جوتش في دوارق نظيفة للاحتفاظ بالراشح بدقة . انقل محتويات البوتقة إلى كأس به ٢٠مل ص أ يد ١٠ ٪ على درجة حرارة ٨٠ – ٩٠ْم ، ورشح واجمع الراشح . عادل الراشح بحمض خليك ٥٠ ٪ في حمام من الثلج . أضف ٤ أمثال الراشح (حجماً) من كحول الإيثايل ٩٥ ٪ ، ويحفظ في الثلاجة حتى يرسب الهيميسليلوز ، فيرشح في بواتق جوتش ، ويغسل بالإيثانول ، ثم بالإيثير ثم بالإيثير البترولي . جفف تحت تفريغ على ٥٠ْم وبرد وزن. احرق وبرد وزن ، فالفارق هو وزن الهيميسليلوز .

١١ ـ اللجنين :

تؤخذ عينة (٢ جم) جافة مطحونة في دورق مخروطي سعة لتر ، ويضاف إليها ٢٥مل H_2SO_4 ٧٢ ٪ (بإضافة ٤٠٠ مل حمض مركز إلى كمية ماء ثم يكمل إلى لتر) ، واتركها على ٢٥ْم لمدة ٧٥ دقيقة مع التحريك من حين لآخر . أكمل الحجم إلى حوالي ٦٠٠ مل بالماء المقطر ، واغل على حمام رملي أسفل مكثف عاكس . رشح على بوتقة جوتش ، واغسل الراسب بالماء المقطر للتخلص من الحموضة جفف البوتقة بمحتوياتها على ١٠٥ْم ، برد واوزن ثم احرق ، وبرد واوزن والفارق هو وزن اللجنين .

وهناك طريقة أخرى تتوقف على الهضم بإنزيم الببسين في حمض HCL .

وهناك طريقة أخرى لتقدير اللجنين بأخذ عينة جافة (٥٠ ـ ١٠٠ مجم) معلومة المحتوى من الرماد يتم تسخينها مع ماء مقطر (٢٠ مل) نصف ساعة على ٧٠ْم مع الرج، ترشح على بوتقة جوتش ، تغسل على البوتقة بماء ساخن ثم ٦ مرات X ٥ مل إيثانول و ٤ مرات X ٥ مل أسيتون و ٤ مرات X ٥ مل دى إيثايل إيثير ، تنقل مكونات الجدر الخلوية مع ورق الترشيح إلى أنبوبة اختبار بغطاء وسخنها على ١٠٠ْم لمدة ١٥ دقيقة . أضف ٥ مل أسيتيل بروميد ٢٥٪ وأغلق الأنبوبة بلطف وسخن نصف ساعة على ٧٠ْم ، برد على درجة حرارة الغرفة بسرعة فى حمام مائى ، ضف ٢٠ مل حمض خليك وسد ورج ثم ضف منها ١ مل إلى ١,٢ مل خلات صوديوم ثلاثية الماء (٢,٠٦٪) فى أنبوبة طرد مركزى بغطاء مع ٧,٥ مل كحول إيثايل + ٠,٣٠ مل هيدروكسيل أمونيوم كلوريد ، سد ورج واطرد مركزيا ١٠ قائق على ١٥٠٠ لفة / دقيقة ، اترك نصف ساعة واقرأ الكثافة الضوئية على ٢٨٠ نانومتر ضد بلانك من الدلائل لمعرفة قيمة (A) الامتصاص حيث :

$$A = \frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} - \text{الكثافة الضوئية للبلانك}}{\text{(C) تركيز المادة العضوية الجافة فى المحلول النهائى (جم / لتر)}}$$

$$\text{حيث } C = \frac{\text{٪ مادة عضوية X وزن العينة X ٤)}}{١٠٠}$$

$$A = \frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} - \text{الكثافة الضوئية للبلانك}}{\text{٪ مادة عضوية X وزن العينة X ٤}} \times ١٠٠$$

وتستخدم قيمة اللجنين هذه (A) فى التنبؤ بمعامل هضم المادة العضوية (DOMD) حيث :

DOMD للسيلاج = ٨٨,٣٠ - ٩,٧٣(A)

DOMD للحشائش = ٩٧,٨٧ - ١٢,٣٠ (A)

إذ إن هناك معامل ارتباط معنوى سالباً بين معامل الهضم ومحتوى اللجنين = -٠,٩٧٩ للسيلاج و - ٠,٩٣٩ للحشائش) .

١٢ ـ نظام المنظفات :

نظراً لأن نظام Weende لتحليل الأعلاف لا يمكن من تقدير اللجنين ، سليلوز ، هيمي سليلوز فقد فكر فريق عمل في تعويض هذا النقص في نظام تحليل الأعلاف المتبع منذ زمن ، والذي يعيبه في هذا المقام أن تقدير الألياف الخام غير دقيق بالمرة ، إذ تؤدي

المعاملة بالحامض والقلوي إلى زوال حوالي ٨٠٪ من البنتوزات ، ٥٠ - ٩٠٪ من اللجنين، ٢٠ - ٥٠٪ من السليلوز ، مما أدى إلى حساب معاملات هضم للألياف الخام مساوية ، أو تفوق معاملات الهضم للمستخلص الخالي النتروچين (لإضافة هذا الفقد في استخلاص الألياف الخام إلى المستخلص الخالي الأزوت المحسوب بالفرق) .

وحيث إن الجدر الخلوية Neutral detergent residue (NDR) (اللجنين ، والسليلوز ، والهيمي سليلوز) غير متجانسة التركيب الكيماوي ، فإنها كذلك غير موحدة القيمة الغذائية . وغالباً ما يفسر ذلك وجود اللجنين بالأنسجة ؛ إذ يرتبط اللجنين كيماوياً مع السكريات العديدة الدعامية ، ويخفض معدلات هضمها .

ومن ذلك وجد أن نظام المنظف detergent system لتجزىء Fractionating المادة الجافة للمرعى قد مكن من تقسيم أجزاء المرعى طبقاً لخواصها الغذائية ، ومكن من تقدير النفع منها ، أو هضمها في الحيوانات المجترة Ruminants كما هو موضح في الجدول التالي .

ولقد وجد أن سليلوز المادة الجافة للمراعى جزء منه مهضوم والآخر غير مهضوم ، ودرجة الهضم للجزء المهضوم تتوقف على سرعة المرور في الكرش Rumen ، إذ إن حوالي ٩٠٪ من هضم السليلوز يتم في الكرش (بينما ٦٦ - ٦٩٪ من هضم الهيميسيليلوز يتم في الكرش) والباقي يتم في الجزء السفلي من القناة الهضمية ، وفي الخيول يتم ٤٧٪ من هضم السليلوز في القولون ، فكلما طالت فترة بقاء السليلوز في الكرش كلما وصلنا لأقصى استفادة من طاقة الألياف .

والألياف الخام Crude Fibers المقدرة بالطريقة العادية دائماً قيمتها أقل بكثير من قيم الجدر الخلوية Cell wall المقدرة بطريقة المنظفات (NDR) ، والتي تشمل اللجنين والسليلوز والهيميسيليلوز ، والسبب راجع لما ذكر من فقد مع الهضم في الحامض والقلوي في الطريقة العادية .

النظام الأساسي في تحليل المراعى باستخدام المنظفات Detergents .

المكون	النفع الغذائى	المحاليل	المعاملة	الناتج
محتويات الخلية	كامل الهضم تقريباً		يحسب بخصم ١٠٠ – جدر الخلية	ليبيدات ، سكريات ، أحماض عضوية ، نشا، بروتينات ذائبة ، أحماض نووية ، بكتين .
جدر الخلية NDR بقايا المنظفات المتعادلة	مفيد جزئياً طبقاً لدرجة اللجننة Lignification	سلفات لوريل صوديوم EDTA بورات PH_7	غليان لمدة ساعة	جدر الخلايا النباتية أقل في البكتين
بقايا المنظفات الحامضية ADR	مفيد جزئياً حسب درجة اللجننة	ستيل ثلاثي ميثيل أمونيوم بروميد في حمض كبريتيك عياري	غليان لمدة ساعة	لجنو سليلوزمعادن غير ذائبة
لجنين	غير مفيد	حمض كبريتيك ٧٢٪	٣ ساعات على ٢٠°م	لجنين خام
لجنين	غير مفيد	برمنجنات بوتاسيوم PH_3	– ١ ساعة على ٢٠°م	لجنين كفقد في الوزن بالأكسدة
سليلوز	مفيد جزئياً حسب درجة اللجننة	—	بقايا الرماد من خطوة اللجنين ١/٢	فقد في الوزن
كيوتين	غير مفيد	حمض كبريتيك ٧٢٪	معاملة السليلوز ٣ ساعات على ٢٠°م	الفضلات هي الكيوتين
سيليكا SiO_2	غير مفيد	حمض بروميك ٤٨٪	معاملة الرماد بالتنقيط لمدة ساعة على ٢٠°م	البقايا هي السيليكا
هيميسيليلوز	مفيد جزئياً حسب درجة اللجننة	—	يحسب بالفرق بين NDR-ADR	—

ADR = Acid detergent residue

EDTA = ethylene diamine tetra - acetic acid

NDR = neutral detergent residue

وفيما يلي وصف لنظام المنظفات والمنسوب إلى العالم Van Soest .

المحاليل المستعملة لهذا التكنيك تتلخص فيما يلي :

أولا : محاليل المنظفات المتعادل : Neutral detergent solutions :

١ ـ أذب ٧٢ جم NaOH في حوالي ٣ لتر مـاء مقطـراً ، ثم أضف ٢٦٣ جم EDTA و ١٢٢,٦ جم بورات صوديوم $Na_2B_4O_7 . 10H_2O$.

٢ ـ أذب ٨٢,١ جم فوسفات صوديوم ثنائية Na_2HPO_4 في حوالي ٤٠٠ مل ماء على حرارة .

٣ ـ أضف كل ما أذيب في إناء سعة ٢٠ لتراً .

٤ ـ أضف ٥٤٠ جم كبريتات لوريل صوديوم Sodium Layryl Sulfate (المذابة في حوالي ٤ لتر ماء) إلى الإناء السابق .

٥ ـ يضاف ١٨٠ مل Ethylene glycol monoethyl ether لمنع الفوران .

٦ ـ أضف ماء حتى ١٨ لتراً للإناء ، واخلط جيداً .

٧ ـ اختبر PH المحلول ثاني يوم ، فيجب أن تكون في مدى ٦,٩ – ٧,١ وإلا فتضبط بإضافة NaOH أو HCl .

ثانياً : محاليل المنظفات الحامضية : Acid detergent solutions :

مكونة من حمض الكبريتيك ١ عياري ١٨ لتراً مذاباً فيها ٣٦٠ جم Cetyltrimethyl ammounium bromide .

ثالثًا : محاليل البرمنجنات المشبعة:

مكونة من ٩٠٠ جم برمنجنات بوتاسيوم $KMnO_4$ + ٠,٩ جم كبريتات فضة Ag_2SO_4 في ماء حتى ١٨ لتراً . وكبريتات الفضة تعمل هنا على نزع الهالوچينات .

رابعًا : محلول منظم لتقدير برمنجنات لجنين :

يذاب نترات الحديديك $Fe(NO_3)_3 . 9H_2O$ (٧٢ جم)مع نترات الفضة (١,٨ جم) في الماء (١,٢ لتراً) ، ثم يضاف حمض الخليك الثلجي (٦ لتر) ، وتذاب خلات البوتاسيوم (٦٠ جم) ، ثم أضف ٤,٨ لتراً tertiary buty alcohol واخلط .

خامسًا : محلول نزع المعادن :

يذاب ٦٠٠ جم أوكساليك $(CO_2H)_2 . 2H_2O$ في كحول الإيثايل ٩٥٪ (٨,٤ لتراً)

ثم يضاف ٦٠٠ مل HCl ١٢ عياري و ٣ لتراً ماء ويخلط .

سادساً : كحول إيثايل ٨٠٪ :

٨,٤٥ لتراً كحول إيثايل ٩٥٪ مع ١,٥٥ لتراً ماء واخلط .

سابعاً : محلول تنظيف :

مكون من ملح EDTA ثنائي الصوديوم ١٠ جم + فوسفات ثلاثي صوديوم ١٠٠جم + هيدروكسيد بوتاسيوم ٤٠٠ جم في ٢ لتر ماء ، مع الحذر لأن هذا المحلول كاوٍ .

ولإجراء هذا التكنيك يجرى كالتالي :

تقدير (ألياف العليقة) جدر الخلايا : Cell wall (dietary fiber) :

والتي تشمل السليلوز والهيميسليلوز ، واللجنين ، وبعض البروتين المرتبط بالألياف ، ويطلق عليها معاً بالألياف غير الذائبة في المنظفات المتعادلة أي Neutral detergent fibre (NDF) . أو مخلفات المنظفات المتعادلة (NDR) :

١ ـ نصف حجم عينة جافة هوائية مطحونة ناعمة في كأس + $\frac{1}{2}$ جم كبريتيت صوديوم لامائي + حوالي ١٠٠ مل محلول منظفات متعادلة واغل في ٥ - ٦ دقائق ، واستمر في الغليان ساعة تحت عاكس .

٢ ـ رشح على بوتقة جوتش باستخدام تفريغ مناسب لمساعدة الترشيح . انقل كافة محتويات الكأس بأقل ما يمكن من الماء الذي يغلي إلى البوتقة . اغسل بالأسيتون ، جفف البوتقة ٨ ساعات أو ليلة على ١٠٠°م (وزن للحصول على جدر الخلايا) ، ثم رمد على ٥٠٠°م لمدة ٣ ساعات على الأقل . الفقد في الوزن بين بعد التجفيف وبعد الترميد ، هو وزن جدر الخلايا (العضوية) أو الألياف غير الذائبة في المنظفات المتعادلة .

الصعوبة في هذا التكنيك هو عملية الترشيح ، ولا ينبغي ترشيح العينة مباشرة على البوتقة الفارغة تحت تفريغ ؛ لذا يشغل التفريغ على أقل ما يمكن ، وبعد إضافة العينة ، وتوضع العينة قليلاً فقليلاً في البوتقة . وإذا كانت العينة غنية بالبروتين فيضاف بروتياز مع محلول المنظفات المتعادل ، أو قد ترشح على ورق ترشيح بدلاً من بواتق جوتش . زيادة المدة في الغليان أسفل العاكس تزيد من احتمال حدوث تفاعلات Maillard . غنى العينة في النشا وبرودتها يعيق الترشيح ، فيضاف الفا أميلاز بكتيري للبوتقة . وفي غنى العينة بالمخاط والصمغ ، فإنها تؤدي لوجود جيل يستلزم إجراء تحلل مائي حامضي .

مخلفات المنظفات الحامضية: Acid detergent residue أو Acid detergent fi-bre (ADF) :

ويشمل اللجنين، والكيوتين، والسليلوز ، والسيليكا . وهو خطوه أساسية في تقدير

اللجنين:

١ ـ زن ١ جم عينة جافة هوائياً مطحونة ناعمة في كأس + ١٠٠ مل محلول منظفات حامضية ، واعمل على أن تغلي في ظرف ٥ - ٦ دقائق ، واضبط الحرارة ، واستمر ساعة في الغليان تحت عاكس .

٢ ـ رشح كما سبق في تقدير جدر الخلايا ، وكرر الغسيل مرتين زيادة بالماء الساخن لإزالة الحموضة ، ثم بالأسيتون حتى زوال أي لون ، ثم بالهكسان . جفف ٨ ساعات أو ليلة على ١٠٠°م ، فالمتخلف هو مخلفات المنظفات الحامضية .

وعادة ADR يكون أكبر من NDR لفعل المنظفات على السليكا . لكن لو لم تحتوي العينة هيميسليلوز فإن ADR سيكون أقل من NDR .

ويتم التصحيح للرماد ، كما تصحح NDR للسليكا لاختلاف ذوبانها ، وذلك بتقدير السليكا في كل من NDR ، ADR . كما قد يرجع سبب ارتفاع قيمة ADR لأثر الحامض على المركبات العضوية الذائبة في المنظفات المتعادلة كالتانينات وحمض الأسبرجيلك ، والتي ترسب في المحاليل الحامضية . وللتصحيح لهذه الترسيبات يجرى تقديرNDR على المتبقي من ADR ، إلا أن اللجنين والكيوتين يذوبان جزئياً في كبريتيت الصوديوم الموجود في تقدير NDR ، إلا أن نقص اللجنين لا يقارن بعدم اكتمال إزالة البروتين (بالكبريتيت) ويتلاشى ذلك في خطوات تالية .

تقدير الهيميسليلوز : بالطرح بين ADR من الجدر الخلوية ، مع عمل حساب الرماد والأزوت واللجنين والكيوتين التي قد توجد في ADR وجدر الخلايا NDR . وإذا بدأ بتقدير NDR بدون إضافة كبريتيت صوديوم ثم ADR فقد تعطي الفرق بينهما أفضل محتوى من الهيميسليلوز.

لجنين حمض الكبريتيك ٧٢٪ : يجرى هذا التقدير على ٢٠ - ٢٢°م :

١ ـ أعدّ بقايا المنظفات الحامضية ADR .

٢ ـ انقل المحتويات بالبوتقة لإناء Enamelled مع إضافة كمية من الأسبستوس (المغسول بالحامض والمرمد ١٦ ساعة) مساوية لكمية ADR ، واخلط بساق زجاجية ، وأضف حمض الكبريتيك ٧٢٪ لتغطية المحتويات ، وقلب وأكمل بالحامض حتى ثلثي البوتقة ، وكل ساعة املأ البوتقة بالحامض وقلب (لمدة ٣ ساعات) ، ورشح تحت تفريغ . اغسل بالماء الساخن للتخلص من الحامض . جفف على ١٠٠°م لمدة ٨ ساعات أو ليلة وزن .

لجنين البرمنجنات ، سليلوز ، سليكا ، كيوتين : تقدر على ٢٠ - ٢٢°م :

١ ـ أعدّ ADR .

٢ ـ اخلط محلول البرمنجنات المشبعة مع محلول منظم لجنين البرمنجنات بنسبة ١/٢ بالحجم (٤٠ مل / تقدير) ، والمخلوط ثابت لمدة يوم واحد .

٣ ـ ضع البوتقة بمحتوياتها ADR في إناء Enameled وضع ماء بارداً في الإناء بحيث لا يلمس ADR . أضف حوالي ٢٠ - ٢٥ مل من المخلوط السابق ، وعندئذ أضف ماء للإناء ليقلل نزول المخلوط من البوتقة . اخلط بساق زجاجي ، أضف مزيداً من مخلوط السوائل لارتفاع ثلثي البوتقة . اترك البوتقة حوالي ٩٠ دقيقة . قلب من حين لآخر . يجب أن يظل المحلول بنفسجياً خلال خطوة إزالة اللجنين . وإذا تحول المحلول للبني أو الطوبي يلزم إضافةمحلول الجديد خاصة في العينات الغنية في اللجنين . وإذا تغير المحلول مع عينات فقيرة اللجنين أو نباتات غير ناضجة فإنه يحدث فقد في الكربوهيدرات السليلوزية . رشح وانقل البوتقة لإناء نظيف ، وأضف حوالي ٢٠ مل محلول إزالة معادن . رشح بعد ٥ دقائق ، وأضف ٢٠ مل أخرى وقلب ، وكرر إزالة المعدنة مرة أخرى ، إذ تستمر إزالة المعدنة ٣٠ - ٦٠ دقيقة .

إزالة اللجننة تتم إذا كان لون الألياف بالبوتقة أبيض إلى رمادي (حسب نوع العينة) مع عدم وجود أي بقايات سوداء من الكيوتين . رشح جيداً ، واغسل مرتين بكحول إيثايل ٨٠٪ ، ثم بالأسيتون ، وجفف على ١٠٠°م لمدة ٨ ساعات أو ليلة ، والفقد في الوزن من ADR هو لجنين البرمنجنات .

٤ ـ إن لم يوجد كيوتين فيمكن ترميد البوتقة على ٥٠٠°م لمدة ٣ ساعات ، وبرد وزن . فالفقد بالحرق يقدر السليلوز .

٥ ـ بعض العينات غنية بالسليكا ، فيلزم تقديرها بمعاملة الرماد بحمض الهيدرو بروميك HBr ٤٨٪ بما لايزيد عن ٤ مل ، لمجرد البلل ، وتترك ١ - ٢ ساعة ثم يسحب حمض الهيدروبرميك ، وتغسل مرتين بالأسيتون ، وترمد على ٥٠٠°م . برد وزن ، فالوزن الباقي في البوتقة هو السليكا .

٦ ـ أكسدة باقي الكيوتين بالبرمنجنات ، والتحلل المائي بحمض الكبريتيك ٧٢٪ . إذا تواجدت كميات كيوتين ، كما في أغلفة البذور ، فإن تحليل لجنين حمض الكبريتيك سيشمل كذلك الكيوتين في جزء اللجنين ، وإذا استعمل تقدير لجنين البرمنجنات ، فإن الكيوتين سيقدر ضمن السليلوز ؛ لذا كان مهماً تقدير الكيوتين .

فبعد إجراء الخطوة رقم ٣ في لجنين البرمنجنات ، يعامل الباقي بحمض كبريتيك ٧٢٪ كما في طريقة لجنين حمض الكبريتيك بدون أسبستوس . جفف البوتقة بمحتوياتها على ١٠٠°م لمدة ٨ ساعات أو ليلة وزن ، فالفقد في الوزن هو السليلوز . رمد على ٥٠٠°م لمدة ٣ ساعات وبرد وزن ، فالفقد في الترميد هو الكيوتين .

نيتروجين المنظفات الحامضية :

١ - أعدّ ADR كما سبق لكن بالترشيح على ورق ترشيح وليس في بوتقة جوتش باستخدام ٢ جم عينة جافة .

٢ - قدر النيتروجين في ADR على ورقة الترشيح (رقم ٥٤) ، كأزوت أو كبروتين (× ٦,٢٥) بالنسبة لوزن العينة الجافة .

التجفيف الساخن على حرارة أعلى من ٥٠ - ٥٥°م يؤدي إلى زيادة معنوية في جدر الخلايا وفي ADR وفي اللجنين . هذه الزيادة ترجع أساساً لتخليق لجنين عن طريق تفاعلات Maillard (التلون اللاإنزيمي) بين الكربوهيدرات والبروتينات ، مكثفة بوليمرات غير ذائبة، ويلعب الماء فيها كعامل مساعد .

وإذا حدث أو توقع حدوث لجنين مخلق ، فيمكن تقديره بإجراء تقدير نيتروجين على بقايا ADR ، ثم يجرى التصحيح بموجب معادلة التصحيح التالية :

$$Lc = 1.208\ Lo - 10.75\ No + 0.42$$

حيث إن Lc هو اللجنين المصحح (لحمض الكبريتيك ٧٢٪) .

Lo هو اللجنين الملاحظ (لحمض الكبريتيك ٧٢٪) .

No كمية النيتروجين في ADR مقدرا بالنسبة لوزن العينة .

أو بالمعادلة

$$Lc = 1.10\ Lo - 7.6No + 0.3$$

ثم من :

لجنين مخلق = لجنين ملحوظ أو مقدر - لجنين مصحح

ADR المصحح = ADR المقدر - اللجنين المخلق .

١٣ - الطاقة الكلية لمواد العلف :

إذا لم يتوفر جهاز المسعر الحراري ، الذي يحرق المادة كهربائيا في جو من الأكسجين، ويقيس الحرارة الناتجة عن هذا الاحتراق ، فإنه يمكن تقدير طاقة الغذاء كيماويا بأكسدته بحامض الكبريتيك في وجود ثاني كرومات البوتاسيوم (كمصدر للأكسجين) وذلك على النحو التالي :

١ - يوزن حوالي ١ جم بالضبط من عينة جافة مطحونة ناعماً جداً ، وتوضع في دورق غليان ذي علامة عند حجم ١١٠٠ مل .

٢ - يضاف ٨٠ مل محلول ثاني كرومات بوتاسيوم (١,٥ عياري ، بإذابة ٣٦٧,٧٢٥ جم ثاني كرومات بوتاسيوم عالية النقاوة في ٥ لتر ماء مقطراً) .

٣ ـ يضاف ١٦٠ مل حامض كبريتيك مركزاً عالي النقاوة ، وترج محتويات الدورق ، ويترك ١,٥ ساعة ، مع الرج من حين لآخر .

٤ ـ يكمل حجم المحلول بالماء المقطر إلى العلامة ، ثم يترك ليبرد ، مع الرج للتجانس .

٥ ـ يؤخذ ١٠٠ مل بدقة في دورق مخروطي ، ويضاف عليها ٤٠ مل يوديد بوتاسيوم (يحضر يومياً بإذابة ١٠٠ جم يوديد بوتاسيوم عالي النقاوة مع ٣٢ جم بيكربونات صوديوم في ٥٠٠ مل ماء مقطراً) .

٦ ـ يحفظ في الظلام لمدة ٢٥ دقيقة ثم يخفف بإضافة ٢٠٠ مل ماء مقطراً .

٧ ـ يضاف ٣-٥ مل دليل نشا (بإذابة ٥ جم نشا ذائب في ١٠٠ مل ماء مقطراً ، أو يغلي ٧ جم حبيبات نشا في ١٠٠ مل ماء مقطراً لمدة دقيقة ، ثم يبرد المحلول ويرشح ويستعمل الراشح) .

٨ ـ ينقط بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم (٠,١٥ عياري ، بإذابة ٣٧,٢٣ جم ثيوكبريتات في لتر ماء مقطر) ، محضرة في نفس اليوم ، حتى يزول اللون الأزرق الدال على وجود اليود .

٩ ـ يجرى عمل الخطوات السابقة على عينة خالية Blank بها كل الإضافات بدون عينة .

١٠ ـ حجم ثاني كرومات مستعملة للعينة الخالية =

$$\frac{\text{١١ × حجم الثيوكبريتات المستعملة في تنقيط ١٠٠ مل × قوة الثيوكبريتات}}{\text{قوة ثاني الكرومات}} \text{ مل .}$$

١١ ـ حجم ثاني كرومات زائدة عما لزم لأكسدة العينة =

$$\frac{\text{١١× حجم الثيوكبريتات المستعملة في تنقيط ثاني الكرومات الزائدة في١٠٠ مل× قوة الثيوكبريتات}}{\text{قوة ثاني الكرومات}} \text{ مل}$$

١٢ ـ حجم ثاني الكرومات المستعملة في أكسدة العينة = خطوة ١٠ − خطوة ١١ .

١٣ ـ ثبت أن خارج قسمة $\frac{\text{مل ثاني كرومات مستوعبة في أكسدة الوزنة}}{\text{الطاقة الكلية بالوزنة بالكيلو كالوري}}$ = ثابت

وهذا الثابت يتوقف على محتوى العينة من الدهن والبروتين كنسب مئوية على أساس المادة الجافة ، ويستخرج هذا الثابت من المعادلة :

٢٣,٥٩ − ٠,٠٨٥٩ × بروتين العينة ٪ + ٠,٠٠٠٤٥٥ × (بروتين العينة ٪)٢ + ٠,٠٠٧٥ × دهن العينة ٪

وبمعرفة هذا الثابت وحجم ثاني الكرومات تحسب طاقة العينة .

١٤ ـ جلوكوز الدم (طريقة الأورثوتولويدين) :

يرسب بروتين الدم بأخذ ٠,١ مل دم + ١ مل حمض ثلاثي كلورو خليك (٣٪) ، واخلط وبعد دقائق اطرد مركزياً . خذ ٠,٥ مل رائق + ٤,٥ مل دليلا ملوناً (١,٥ جم ثيويوريا تذاب في ٩٤٠ مل حمض خليك ثلجي + ٦٠ مل أورثوتولويدين ، ويحفظ بعيداً عن الضوء والمعادن والمطاط ، فيكون صالحاً لمدة شهرين) واخلط وحضن في حمام مائي يغلي ٨ دقائق . برد وقس الكثافة الضوئية للمحلول الأخضر المزرق على ٦٣٠ نانومتر ضد بلانك من حمض ثلاثي كلوروخليك بدلاً من الرائق للعينة . يجري تقدير لمحلول جلوكوز قياسي (١٠٠ مجم جلوكوز في ١٠٠ مل محلول حمض بنزويك ٠,٢٪) بنفس الخطوات لتقدير تركيز الجلوكوز بالمليجرام / ١٠٠ مل

$$= \frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}} \times \text{تركيز الجلوكوز في المحلول القياسي}$$.

ويزيد تركيز جلوكوز الدم في حالة زيادة نشاط غدد الدرقية والنخامية والأدرينال والبنكرياس ، وكذلك في بعض الأمراض المعدية ، والتهاب المخ والسرطانات ، والنزيف ، وتحت تأثير التخدير . بينما نقص الجلوكوز في الدم يسببه زيادة إفراز الإنسولين ، كما في حالة خراج البنكرياس ، وكذلك فى حالة نقص نشاط غدد النخامية ، والأدرينالين ، وكذلك للإجهاد العضلى ، واستنزاف چليكوچين الكبد ، أو لأمراض الكبد ، وكذلك لعدم قدرة تحويل الچليكوچين إلى جلوكوز ، لغياب إنزيم جلوكوز – ٦ – فوسفاتاز .

١٥ ـ سكر البول :

٢٥ مل من محلول بنيديكت [٢٠٠ جم سترات صوديوم + ٧٥ جم كربونات صوديوم + ١٢٥ جم ثيوسيانات بوتاسيوم في ٦٠٠ مل ماء مع التسخين البسيط ، والترشيح والتبريد ، ثم إضافة ١٨ جم كبريتات نحاس مذابة في ١٠٠ مل ماء . أضف ٥ مل حديد وسيانيد بوتاسيوم ٥٪ ، وأكمل إلى لتر بالماء المقطر . إن لم يكن المحلول رائقاً فرشح] في دورق دائري القاعدة سعة ١٠٠ مل أو كأس ، ثم أضف ٣ – ٤ جم كربونات صوديوم ، واغل ، وأثناء الغليان أضف البول ببطء من سحاحة وهز جيداً . يترسب لون أبيض ، ويختفي اللون الأزرق تدريجياً . قلل معدل إضافة البول عندما تقترب من نقطة النهاية حتى تصير تنقيطاً . ونقطة النهاية تصل إليها حال ما يختفي اللون الأزرق كلية . أفضل تقطير يكون ما بين ٨ – ١٢ مل بولاً ، وهذا يعادل حوالي ٠,٥٪ جلوكوز .

وحيث إن ٠,٠٥ جم جلوكوز تختزل ٢٥ مل محلول نحاس قلوي ، فإن كمية الجلوكوز جم / ١٠٠ مل بول = $\frac{N \times ١٠٠ \times ٠,٠٥}{\text{مل لزمت للتقطير}}$

حيث N عدد مرات تخفيف البول (إن خفف) .

ويتواجد السكر في البول في حالة زيادة استهلاك الكربوهيدرات بشدة ، لكن يوجد في حالات مرضية كمرض السكر ، وأمراض الجهاز العصبي المركزي ، وبعد الذبحة الصدرية ، وفي التسممات ، وبعد تناول جرعات عالية من الكورتيكويد .

١٦ ـ جليكوچين الكبد والعضلات :

المحاليل :

١ ـ دليل الأنثرون : يحضر محلول يحتوي ٠,٠٥ ٪ أنثرون ، ١ ٪ ثيويوريا و ٧٢ ٪ بالحجم حمض كبريتيك . فلكل لتر من الدليل يوضع ٢٨٠ مل ماء مقطراً ، وبحذر يضاف إليها ٧٢٠ مل حمض كبريتيك مركزاً عالي النقاوة . وفي إناء آخر يوضع ٥٠٠ مجم أنثرون نقي + ١٠ جم ثيويوريا عالي النقاوة + لتر حمض كبريتيك ٧٢ ٪ . دفئ المخلوط على ٨٠-٩٠°م مع الرج من حين لآخر . برد واحفظ في ثلاجة ، فيستمر صالحاً للاستخدام لمدة أسبوعين .

٢ ـ حمض ثلاثي كلوروخليك ٥ ٪ .

٣ ـ إيثانول ٩٥ ٪ .

٤ ـ محلول قياسي جلوكوز : أذب ١٠٠ مجم جلوكوز جافاً عالي النقاوي في ١٠٠ مل محلول حمض بنزويك مشبعاً . خفف منه ٥ مل إلى ١٠٠ مل بمحلول حمض البنزويك المشبع فيكون تركيزه ٠,١ مجم جلوكوز / ٢ مل .

ويجرى التقدير كالتالي :

١ ـ تجنس العينة معلومة الوزن مع حجم معلوم من حمض ثلاثي كلوروخليك لمدة ٣ دقائق ، ثم اطرد مركزياً ، ورشح الرائق على ورقة ترشيح مغسولة بالحامض في قمع على مخبار . انقل كمياً المتبقي إلى خلاط مع حجم معلوم من حمض ثلاثي كلورو خليك ، وجنس ثانية لمدة دقيقة . اطرد مركزياً ، ورشح الرائق على نفس ورقة الترشيح . أكمل إلى حجم معلوم بحمض ثلاثي كلورو خليك واخلط .

٢ ـ انقل ١ مل من المستخلص السابق إلى أنبوبة طرد مركزي مع ٥ مل كحول إيثيل ٩٥ ٪ ، واخلط بحذر ، ثم سد الأنابيب بسدادة مطاط ، واتركها ليلة على حرارة الغرفة (أو ضعها في حمام مائي ٣٧-٤٠°م لمدة ٣ ساعات) .

٣ ـ بعد تمام الترسيب ، اطرد مركزياً ١٥ دقيقة بسرعة ٣٠٠٠ لفة / دقيقة واسكب الرائق بحذر ، واقلب الأنابيب للتخلص من السائل لمدة ١٠ دقائق .

٤ ـ أذب الجليكوچين الراسب في الأنابيب بإضافة ٢ مل ماء على الجدران ، ورج لتمام الذوبان .

٥ ـ تجرى تجربة خالية على ٢ مل ماء في أنبوبة نظيفة ، كما يجرى تقدير لمحلول قياسي بسحب ٢ مل محلول جلوكوز قياسي في أنبوبة أخرى.

٦ ـ أضف ١٠ مل دليل أنثرون إلى كل الأنابيب ، مع سدها وتبريدها تحت صنبور مياه ، ثم ضعها في حمام ماء يغلي ١٥ دقيقة ، ثم انقلها إلى حمام ماء بارد على درجة حرارة الغرفة ، ثم اقرأ الكثافة الضوئية على ٦٢٠ نانومتر بعد تصفير الجهاز على التجربة الخالية .

٧ ـ احسب تركيز الجليكوچين مجم / ١٠٠ جم =

$$\frac{\text{قراءة العينة} \times ٠,١ \times \text{حجم المستخلص} \times ١٠٠ \times ٠,٩}{\text{قراءة المحلول القياسي} \times \text{وزن العينة جم}}$$

حيث إن ٠,٩ = معامل تحويل الجلوكوز إلى چليكوچين .

هذا وينصح بالرجوع للمراجع التالية لمزيد من المعلومات :

ـ عبد القادر راشد أبو عقادة ، مصطفى محمد أبو النجا (١٩٧٠) : طرق التحليل الغذائي ـ دار المعارف بالإسكندرية .

ـ مصطفى مرسى (وآخرون) : أساسيات البحوث الزراعية ـ مكتبة الأنجلو المصرية (١٩٦٨) .

- Carroll, N. V. et al. (1956) J. Biol. Chem., 220 : 583.

- Close, W. & Menk, K. H. (1986) Selected topics in animal nutrition . Deutsche stiftung fur Internationale Entwicklung, Feldafing, Germany .

- Egan, H. et al. (1981) pearsonðs chemical Analysis of Foods . 8th Ed., Churchill, Edinburgh & London .

- Englyst, H. N. & Cummings, J. H. (1984) Analyst, 109 : 937.

- Farid, M. F. A. (1976) Alex . J. Agric. Res., 24 : 457 .

- Golding, E. J. et al (1985) J. Dairy sci., 68 : 2732 .

- Gruenwedel, D. W. & Whitaker, J. R . (1985) Food Analysis. Vol. 3. Marcel Dekker, N. Y.

- Holme, D. J. & peck, H. (1993) Analytical Biochemistry . 2 nd Ed., Longman, Printed in Singapore .

- Hyvarinen, A. & Nikkila, E. A. (1962) Clin . Chim . Acta, 7: 140 - J. AOAC (1975) Journal of the Association of official Agricultural Chemists 12 thEd Washington .

- Johnson, D. R, et al, (1961) Tappi , 44 : 793 .

- Lees, R. (1975) Food Analysis . 3 rd Ed . Leonard Hill Books, London .

- Leitgeb, R. (1979) Futtermittelkunde , Vorlesungen, Univ . f. Boku, Wien .

- Merck, E. (1974) Klinisches Labor . 12 . Auflage, Merck, Darmstadt

- Minson, D. J. & Mclead , M. N. (1972) Division of tropical pastures, tech. paper. No. 8 Commonwealth scientific & industrial research organization, Australia.

- Rodertson, J. B. (1978) In : Spiller, G. A. & A men , R. J. (ed.) . Topics in dietary fiber research . Plenum press , N. Y .

- Spiller, G. A. & Amen . R. J. (1978) Topics in dietary fiber research, plenum press , N. Y .

- Sudekum, K. _ H. et al. (1993) Proc . Soc., Nutr . Physiol., 1 : 13 .

- The Feeding stuffs (Sampling and Analysis) Regulations 1982 . Agriculture 1982 No. 1144. Her Majesty as Stationery Office, London.

- Tilley , J. M. A. & Terry, R. A. (1963) J. Br. Grassl . Soc., 18 : 104

.- Varley, H. (1978) Practical Clinical Biochemistry . 4 th Ed . Arnold - Heinemann, India .

- Walker, M. (1965) AOAC . 29 : 039 & 43 : 012 .

- Wootton , I . O. P. (1974) Microanalysis in Medical Biochemistry, 5 th Ed., Churchill . , London .

الفصل الخامس

الإنزيمـــات

نظراً لتعدد طرق التعبير عن النشاط الإنزيمي بوحدات مختلفة ، فقد أوصى بالتعبير عن النشاط الإنزيمي بالوحدات الدولية / مل ، وعرفت الوحدة الدولية للنشاط الإنزيمي بأنها النشاط الذي يحول ميكرومول من المادة في دقيقة تحت ظروف معينة . وقد يعبر عنها كذلك بجزء من ألف من الوحدة الدولية (Milli - international units (m - i. u وهي تكافئ مللي ـ ميكرومول محول في دقيقة ، ويعبر عنها كذلك بمللي وحدة دولية / مل (جم) ، أو وحدة دولية / لتر .

١ ـ إنزيم اليورياز Urease activity :

يقدر في منتجات الصويا للكشف عما إذا كانت مطبوخة بقدر كاف أم لا .

١ ـ زن حوالي ١٠ جم عينة ، وتطحن لتمر خلال منخل ثقوبه ٠,٢ م ، ثم زن منها حوالي ٠,٢جم بالضبط في أنبوبة اختبار مع ١٠ مل محلول يوريا (٣٠جم يوريا تذاب في لتر من محلول منظم فوسفات (٤,٤٥ جم فوسفات صوديوم أحادي الهيدروچين + ٣,٤٠ جم فوسفات بوتاسيوم ثنائي الهيدروچين في ماء ، وتخفف إلى لتر) ، يحضر طازجاً قبل الاستعمال مباشرة) . سد الأنبوبة في الحال ، ورج بشدة واتركها تستقر ٣٠ دقيقة في حمام مائي (٣٠ْم) .

٢ ـ أضف في الحال بماصة ١٠ مل حمض هيدروكلوريك (٠,١ عياري) وبرد بسرعة إلى ٢٠ْم ، ثم انقل محتويات الأنبوبة كميا إلى إناء المعايرة مع غسيل الأنبوبة مرتين بالماء (٥ مل) ، نقط في الحال بهيدروكسيد صوديوم (٠,١ عياري) في وجود جهاز تقدير تركيز أيون الهيدروچين إلى PH ٤,٧ .

٣ ـ يعمل تجربة مقارنة بها ٠,٢ جم عينة + ١٠ مل حمض هيدروكلوريك (٠,١ عياري) + ١٠ مل محلول يوريا ، وبرد في ماء مثلج لمدة ٣٠ دقيقة ، وأكمل كما في باقي خطوة رقم ٢ .

٤ ـ احسب نشاط إنزيم اليورياز مجم نيتروچين أمونيومي / جم / دقيقة على ٣٠ْم =

$$\frac{\text{١,٤ (حجم القلوي المستخدم للمقارنة مل − حجم القلوي المستخدم للعينة مل)}}{\text{٣٠ × وزن العينة جم}}$$

٢ ـ إنزيم الببسين :

يستخدم الببسين في تقدير البروتين الخام الذائب في الببسين والهيدروكلوريك (المهضوم معمليا) ؛ لذا وجب تقدير نشاط هذا الإنزيم لحساب الكم اللازم منه لعملية تقدير البروتين المهضوم معمليا . ويقدر نشاط الببسين كالتالي :

١ ـ عد محلول الببسين بإذابة ١٥٠ مجم ببسين في ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك (٠,٠٦ عياري) ، وانقل بواسطة ماصة ٢ مل من هذا المحلول إلى دورق ٥٠ مل ، وخفف إلى ٥٠ مل بحمض الهيدروكلوريك (٠,٠٢٥ عياري) . وبواسطة جهاز PH اختبر PH لتكون ١,٦ ± ٠,١ ، عندئذ اغمس الدورق في حمام مائي (٢٥°م) .

٢ ـ يجرى التحليل المائي بنقل ٥ مل محلول هيموجلوبين (يقدر نيتروجين الهيموجلوبين بطريقة كلداهل ، ثم يوزن منه كمية تحتوي ٣٥٤ مجم نيتروجين في دورق سعة ٢٠٠ مل مع نقط من حمض هيدروكلوريك (٠,٠٦ عياري) ووصل بمضخة تفريغ ، وهز الدورق تحت التفريغ حتى يذوب الهيموجلوبين تماماً . افصل التفريغ ، وأثناء الهز خفف إلى العلامة بحمض الهيدروكلوريك (٠,٠٦ عياري) ويحضر المحلول في الحال عند الاستخدام) بواسطة ماصة إلى أنبوبة اختبار، وسخن على ٢٥°م في حمام مائي، ثم أضف ١ مل محلول ببسين (خطوة رقم ١) ، واخلط جيداً ، واحفظ في حمام مائي لمدة ١٠ دقائق على ٢٥°م ، ثم أضف ١٠ مل محلول حمض ثلاثي كلوروخليك (٥٪) سبق تسخينها على ٢٥°م ، واخلط ورشح .

٣ ـ تطوير اللون والتقدير : ينقل بماصة ٥ مل من الراشح (من خطوة رقم ٢) إلى دورق مخروطي ٥٠ مل وأضف ١٠ مل محلول هيدروكسيد صوديوم (٠,٥ عياري) ، وهز الدورق باستمرار ، وأضف ٣ مل محلول مخفف فولين سيوكالتيو Folin - Ciocalteu (أذب ١٠٠ جم تنجستات صوديوم ثنائي الماء + ٢٥ جم موليبدات صوديوم ثنائي الماء في ٧٠٠ مل ماء تحت مكثف عاكس ، ثم أضف ٥٠ مل حمض فوسفوريك + ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ، واغل لمدة ١٠ ساعات . برد وأضف ١٧٥ جم كبريتات ليثيوم ثنائي الماء + ٥٠ مل ماء + ١ مل برومين ، واغل لمدة ١٥ دقيقة دون مكثف ، وبرد وانقل إلى دورق سعة لتر ، وخفف إلى العلامة بالماء واخلط ورشح . ينبغي خلو المحلول الناتج من أي لون أخضر . خفف حجما من هذا الدليل بحجمين من الماء قبل الاستخدام)، قس الامتصاص الضوئي على ٧٥٠ نانومتر بعد ٥ – ١٠ دقائق مع استخدام الماء للمقارنة .

٤ ـ يعمل منحنى قياسي من ١، ٢، ٣، ٤، ٥ مل من محلول قياسي تيروزين (أذب ١٨١,٢ مجم تيروزين في حمض هيدروكلوريك (٠,٢ عياري) ، وخفف إلى لتر بالحامض ، وانقل بماصة ٢٠ مل من هذا المحلول في دورق ١٠٠ مل ، وأكمل إلى العلامة بحمض الهيدروكلوريك (٠,٢ عياري) ، ١ مل من هذا المحلول تحتوي ٠,٢ ميكرومول تيروزين) وأكمل بعمل دورق خال من التيروزين ، أكمل حجوم الدوارق كلها (المحتوية على حجوم متدرجة أو خالية التيروزين) إلى ٥٠ مل بحمض الهيدروكلوريك (٠,٢ عياري) ، ثم أضف ١٠ مل هيدروكسيد صوديوم (٠,٥ عياري) ، وهز باستمرار مع إضافة ٣ مل دليل فولين. وقس الامتصاص كما سبق وارسم المنحنى القياسي.

٥ ـ من المنحنى القياسي تقدر كمية التيروزين (ميكرومول) المعادلة للعينة ، ومنها تحسب نشاط الببسين بالميكرومول تيروزين / مجم / دقيقة على ٢٥ْم من المعادلة :

$$\text{وحدات / مجم} = \frac{\text{٠,٣٢} \times \text{كمية التيروزين بالميكرومول الموجودة في العينة}}{\text{وزن الببسين (مجم) المضاف في عملية التحليل المائي}}$$

يلاحظ أن كمية الببسين المضافة في تحضير محلول الببسين (الخطوة الأولى) يجب أن تضبط لتعطي امتصاصاً ٠,٣٥٠ ± ٠,٠٣٥ بعد ٥ – ١٠ دقائق .

كل ٢ وحدة / مجم / يتحصل عليها من هذه الطريقة تعادل ٠,٠٠٣٦٤ وحدة Anson/ مجم (ميكرومول تيروزين / مجم / دقيقة على ٣٥,٥ْم) ، أو ٣٦٤٠٠ وحدة تجارية / جم (ميكرومول تيروزين / جم في ١٠ دقائق على ٣٥,٥ْم) .

٣ ـ مثبط التربسين :

يوزن ٤ جم فول صويا منزوع الدهن ومطحوناً ، وتعامل بمقدار ٤٠ مل محلول منظم صوديوم ٠,٠٥ ع PH ٧ + ٤٠ مل ماء مقطراً . وترج ٣ ساعات وتطرد مركزياً ٣٠ دقيقة على ١٥٠ْم . يرشح الرائق ، ويخفف إلى ١٠ أضعاف بنفس المحلول المنظم .

يستخدم محلول كازين ٢ ٪ في محلول منظم فوسفات ٠,١ عياري PH ٧,٦ كمادة للتفاعل ، بينما يستخدم إنزيم التربسين (٥ مجم / مل) كمحلول إنزيمي . يحضن ٠,٥ مل محلول تربسين مع ٢ مل محلول كازين + ١ مل محلول منظم فوسفات + ٠,٤ مل حمض هيدروكلوريك ٠,٠٠١ عياري + ٠,١ مل مستخلص عينة . حضن على ٣٧ْم لمدة ٢٠ دقيقة ، ثم أضف ٦ مل حمض ثلاثي كلوروخليك ٥ ٪ لوقف التفاعل .

وحدة التربسين عبارة عن الزيادة بمقدار ٠,٠١ وحدة امتصاص على ٢٨٠ نانومتر في ٢٠ دقيقة لمخلوط تفاعل ١٠ مل ، ونشاط مثبط التربسين يعبر عنه بوحدات التربسين المثبطة .

٤ - إنزيمات الترانس أميناز Transaminases :

توجد هذه الإنزيمات في كل الأنسجة ، وأهمها من الناحية المرضية هي جلوتاميك أوكسالو أسيتيك ، جلوتاميك بيروفيك ترانس أميناز ، فيقوم كل منهما بإنتاج حمض بيروفيك (من حمض أميني إسبارتك ، وحمض أميني ألانين على الترتيب) الذي ينتج لوناً بنيا من الهيدرازون بالتفاعل مع دي نيتروفينيل هيدرازين .

إصابة أي نسيج بالنكرزة Necrosis يؤدي إلى تحرير هذه الإنزيمات بكم كبير في السيرم. وتقدير كثافة ضوء اللون البني تتناسب طردياً مع النشاط الإنزيمي .

وللتقدير يتطلب المحاليل التالية :

١ - محلول منظم فوسفات PH ٧,٤ : يتكون بإذابة ١١,٩٢ جم فوسفات ثنائي الصوديوم جافة + ٢,١٨ جم فوسفات أحادي بوتاسيوم جافة في ماء ، ويكمل إلى لتر ويحفظ في ثلاجة .

٢ - مادة الجلوتاميك أوكسالو أسيتيك: زن ٠,٠٥٨٤جم حمض الفاكيتو جلوتاريك + ٥,٣٢ جم حمض دل - أسبارتك في كأس ، وأضف عليها ٤٠ مل محلول هيدروكسيد صوديوم عياري ، وقلب واستخدم جهاز PH لضبط الحموضة على ٧,٤ باستخدام نقط من هيدروكسيد صوديوم عياري مع التقليب . انقل المحلول كميا إلى دورق معياري ٢٠٠ مل باستخدام محلول منظم فوسفات PH ٧,٤ ، وأكمل إلى العلامة بنفس المحلول ، ثم أضف ٢ مل كلورفورم واحفظ في ثلاجة .

٣ - دليل لون : أذب ٠,٠٣٩٦ جم دي نيتروفينيل هيدرازين في ٢٠٠ مل حمض هيدروكلوريك عياري باستخدام مقلب مغناطيسي واحفظ في ثلاجة .

٤ - هيدروكسيد صوديوم ٠,٤ عياري : أذب ١٦ جم هيدروكسيد صوديوم في لتر ماء.

٥ - مادة الجلوتاميك بيروفيك : زن ٠,٠٢٩٢ جم حمض الفاكيتو جلوتاريك + ١,٧٨ جم حمض دل – ألانين في كأس ، وأضف عليها ٢٠ مل ماء ، وقلب لتمام الذوبان ، اضبط PH على ٧,٤ باستخدام جهاز PH وصودا كاوية عيارية بالتنقيط والتقليب، انقل كميا إلى دورق معياري ١٠٠ مل ، وأكمل بمحلول منظم فوسفات PH ٧,٤ ، وأضف ٢ مل كلورفورم واحفظ في ثلاجة .

٦ - محلول قياسي : أذب ٤٤ مجم بيروفات صوديوم نقية في ١٠٠ مل محلول منظم فوسفات PH ٧,٤ لتكوين محلول قياسي تركيز ٤ ملي مول / لتر .

التقدير : تجرى الخطوات التالية لتقدير نشاط الترانس أميناز :

الإنزيم	العينة	المقارنة	المحلول القياسى	بلانك
جلوتاميك بيروفيك ترانس أميناز .	٠,٥ مل مادة جلوتاميك بيروفيك تدفأ على ٣٧ْم ٣ دقائق . أضف ٠,١ مل بلازما . حضن ٣٠ دقيقة . أضف ٠,٥ مل دليل لون .	٠,٥ مل مادة جلوتاميك بيروفيك + ٠,٥ مل دليل لون + ٠,١ مل بلازما .	٠,١ مل محلول قياسي + ٠,٤ مل مادة جلوتاميك بيروفيك + ٠,١ مل ماء + ٠,٥ مل دليل لون .	٠,٥ مل مادة جلوتاميك بيروفيك + ٠,١ مل ماء + ٠,٥ مل دليل لون.
جلوتاميك أوكسالو أسيتيك ترانس أميناز .	٠,٥ مل مادة جلوتاميك أوكسالو أسيتيك تدفأ على ٣٧ْم ٣ دقائق . أضف ٠,١ مل بلازما . حضن ٦٠ دقيقة . أضف ٠,٥ مل دليل لون	٠,٥ مل مادة جلوتاميك أوكسالو أسيتيك + ٠,٥ مل دليل لون + ٠,١ مل بلازما .	٠,١ مل محلول قياسي + ٠,٤ مل مادة جلوتاميك أوكسالو أسيتيك + ٠,١ مل ماء + ٠,٥ مل دليل لون.	٠,٥ مل مادة جلوتاميك أوكسالو أسيتيك + ٠,١ مل ماء + ٠,٥ مل دليل لون .

تترك جميع الأنابيب ٢٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة ، ثم يضاف إلى كل منها ٠,٥ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,٤ عياري ، وتخلط المحتويات جيداً ، وتترك ١٠ دقائق ثم تقدر الكثافة الضوئية على طول موجة ٥١٠ نانومتر مع تصفير الجهاز على البلانك .

احسب كمية البيروفات المتكونة في الدقيقة لكل لتر بلازما من المعادلة :

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} - \text{الكثافة الضوئية للمقارنة}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}} \times \frac{٠,٤}{٦٠} \times \frac{١٠٠٠}{٠,١} = \text{ميكرومول}$$

فى حالة تقدير الجلوتاميك أوكسالو أسيتيك ترانس أميناز ، ومن المعادلة التالية فى حالة تقدير نشاط الجلوتاميك بيروفيك ترانس أميناز :

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} - \text{الكثافة الضوئية للمقارنة}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}} \times \frac{٠,٤}{٣٠} \times \frac{١٠٠٠}{٠,١} = \text{ميكرومول .}$$

ثم تستنبط الوحدات الدولية لنشاط الإنزيم المقابلة لتركيز البيروفات من الجدول التالي :

تحويل تركيز البيروفات بالميكرومول / دقيقة / لتر إلى وحدات دولية للترانس أميناز.

البيروفات	جلوتاميك أوكسالو أسيتيك	جلوتاميك بيروفيك	البيروفات	جلوتاميك بيروفيك
٢	٢	١	٥٦	٢٤
٤	٣	٢	٥٨	٢٥
٦	٥	٢	٦٠	٢٦
٨	٦	٣	٦٢	٢٧
١٠	٧	٤	٦٤	٢٩
١٢	٩	٤	٦٦	٣٠
١٤	١١	٥	٦٨	٣١
١٦	١٣	٦	٧٠	٣٣
١٨	١٥	٧	٧٢	٣٤
٢٠	١٧	٧	٧٤	٣٥
٢٢	١٩	٨	٧٦	٣٦
٢٣	٢٠*	٨	٧٨	٣٧
٢٤	٢١	٩	٨٠	٣٨
٢٦	٢٣	٩	٨٢	٣٩
٢٨	٢٥	١٠	٨٤	٤٠
٣٠	٢٧	١١	٨٦	٤٢
٣٢	٢٩	١٢	٨٨	٤٤
٣٤	٣١	١٣	٩٠	٤٦
٣٦	٣٣	١٤	٩٢	٤٨
٣٨	٣٥	١٥*	٩٤	٥٠
٤٠	٣٧	١٦	٩٦	٥٢
٤٢	٣٩	١٧	٩٨	٥٤
٤٤	٤١	١٨	١٠٠	٥٦
٤٦	٤٤	١٩	١٠٢	٦٠
٥٠	٥١	٢١		
٥٢	٥٥	٢٢		
٥٤	٦٠	٢٣		

* الحد الأعلى الطبيعي .

ويرتفع نشاط إنزيمات الترانس أميناز في حالات مرضية كثيرة كالذبحة الصدرية ، والتهاب القلب الحاد ، واحتقان القلب وقصوره ، وفي أمراض خلايا الكبد ، وبوجه عام فالارتفاع المحدود يصاحب أمراض الكبد ، بينما الارتفاع الشديد يصاحب أمراض القلب . ويكون الارتفاع في نشاط إنزيم الجلوتاميك أوكسالو أسيتيك أكثر منه لإنزيم الجلوتاميك بيروفيك ترانس أميناز .

٥ ـ إنزيم اللاكتيك دي هيدروچيناز Lactic Dehydrogenase :

يوجد هذا الإنزيم في الأنسجة ، ويقوم بمساعدة أكسدة حمض اللاكتيك إلى حمض بيروفيك في وجود النيكوتيناميد أدينين دي نيوكليوتيد (NAD) ، كما يساعد اختزال حمض البيروفيك إلى لاكتيك في وجود هذا الإنزيم المختزل ($NAD\ H_2$) . وفي تقدير هذا الإنزيم يتفاعل حمض البيروفيك الناتج مع دي نيتروفينيل هيدرازين لتكوين معقد أصفر اللون ، تتناسب كثافته الضوئية مع نشاط الإنزيم .

المحاليل :

١ ـ محلول منظم بيروفات : أذب ١٠ جم فوسفات ثنائي بوتاسيوم ثلاثي الماء (أو ٧,٧ جم فوسفات ثنائي بوتاسيوم جافة) + ٠,٢ جم حمض بيروفيك في ماء وأكمل إلى لتر . أضف نقطة فورمالين كمادة حافظة .

٢ ـ مادة البيروفات : قبل العمل بساعة يخلط ١٠ مل محلول منظم بيروفات مع ٠,٠١ جم إنزيم $NAD\ H_2$.

٣ ـ محلول ملون : أذب ٠,٢ جم ٢-٤- دي نيتروفينيل هيدرازين في ٨٥ مل حمض هيدروكلوريك مركز ، وأكمل إلى لتر بالماء .

٤ ـ هيدروكسيد صوديوم ٠,٤ عياري : أذب ١٦ جم صودا كاوية في لتر ماء .

التقدير :

أضف ٠,٠١ مل سيرم إلى ٠,٥ مل مادة البيروفات ، واخلط وحضن على ٣٧ْم لمدة ٤٥ دقيقة . أضف ٠,٥ مل محلولاً ملوناً ، واخلط واترك ٢٠ دقيقة على حرارة الغرفة . أضف ٥ مل صودا كاوية ٠,٤ عياري ، واخلط واترك ٣٠ دقيقة على حرارة الغرفة ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٥٠٥ نانومتر مع تصفير الجهاز على ماء .

أجر منحنىً قياسيا على كميات متدرجة من محلول منظم بيروفات وماء ، وإلى كل أنبوبة يضاف ٠,٥ مل محلولاً ملوناً ويجرى عليها كما في العينات .

تحضير المنحنى القياسي من البيروفات وما يقابلها من وحدات إنزيم :

محلول منظم بيروفات مل	ماء مقطر مل	وحدات إنزيم لاكتيك دي هيدروچيناز / مل
٠,٥	صفر	صفر
٠,٤	٠,١	٣٠٠
٠,٣	٠,٢	٧٠٠
٠,٢	٠,٣	١٠٠٠
٠,١	٠,٤	١٥٠٠
٠,٠٥	٠,٤٥	٢٠٠٠

ويعبر عن نشاط الإنزيم بالوحدات / مل سيرم ، أو بالوحدات / جم نسيجاً طازجاً (مع عمل حساب معامل التجفيف) .

ومتوسط نشاط الإنزيم / مل سيرم ٤٠٠ ± ١٢٠ وحدة ، بينما المدى الطبيعي ٢٠٠ – ٦٨٠ وحدة . وتقدير نشاط الإنزيم هذا ذو أهمية في تشخيص أمراض الذبحة الصدرية ، والتي يستمر ارتفاع نشاط الإنزيم فيها لمدة تصل إلى ١٤ يوماً من حدوث الذبحة . كما يستدل منه على التشخيص المبكر للإصابة بالسرطان . وقد سجل ارتفاع نشاط الإنزيم في البول في حالة سرطان الكلى ، وفي السائل النخاعي في حالة خراج المخ ، وفي السيرم في حالة سرطان الدم الخطير Leukemia ، وفي خراجات الجهاز العصبي المركزي ، وأمراض الكلى ، والفشل الوظيفي للرئة وللقلب ، وفي أمراض الكبد ، وضمور العضلات .

٦ ـ إنزيم الفوسفاتاز القاعدي Alkaline Phosphatase :

يقوم هذا الإنزيم بتحليل عديد من الفوسفات العضوية أحادية الإستر ، والبيروفوسفات وتحرر فوسفات غير عضوي . ولتقديره تحضن العينات (المحتوية على الإنزيم) مع فوسفات فينيل ثنائي الصوديوم ، فيتحرر الفينول الذي يتم تقديره ضوئيا ، إذ تناسب تركيزات لونه مع النشاط الإنزيمي .

المحاليل :

١ ـ محلول منظم PH ١٠,١٤ : أذب ٦,٣٦ جم كربونات صوديوم لامائية + ٣,٣٦ جم بيكربونات صوديوم في لتر ماء واحفظ في ثلاجة .

٢ ـ المادة الفعالة : أذب ٢,١٨ جم فوسفات فينيل ثنائي الصوديوم في لتر ماء ، واغل بسرعة للتعقيم ، برد واحفظ بقليل من الكلوروفورم (٤ مل) ، واحفظ في ثلاجة .

٣ ـ محلول قياسي : أذب ١ جم فينول (كريستال) نقي في لتر حمض هيدروكلوريك ٠,١ عياري ، واحفظ بعيداً عن الضوء في ثلاجة . خفف ١ مل إلى ١٠٠ مل بالماء مع نقط من الكلوروفورم ، واحفظ بعيداً عن الضوء على ٤°م .

٤ ـ هيدروكسيد صوديوم ٠,٥ عياري : أذب ٢٠ جم هيدروكسيد صوديوم في لتر ماء.

٥ ـ بيكربونات صوديوم ٠,٥ عياري : أذب ٤٢ جم بيكربونات صوديوم في لتر ماء .

٦ ـ أمينو أنتي بيرين : أذب ٦ جم من ٤ – أمينو أنتي بيرين في لتر ماء ، واحفظ بعيداً عن الضوء في ثلاجة .

٧ ـ حديدي سيانيد بوتاسيوم : أذب ٢٤ جم حديدي سيانيد بوتاسيوم في لتر ماء ، واحفظ بعيداً عن الضوء .

التقدير يتم بالخطوات التالية :

العينة	المقارنة	المحلول القياسي	البلانك
١مل محلولاً منظماً + ١مل مادة فعالة وحضن على ٣٧°م في حمام ماء ٣ دقائق . أضف ٠,١ مل سيرم . حضن ١٥ دقيقة ثم أضف ٠,٨ مل هيدروكسيد صوديم ٠,٥ عياري .	١مل محلولاً منظماً + ١مل مادة فعالة + ٠,٨ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,٥عياري ثم او . مل سيرم .	١,١ مل محلولاً منظماً+ ١ مل محلولاً قياسياً + ٠,٨ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,٥عياري.	١,١ مل محلولاً منظماً+ ١مل ماء + ٠,٨ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,٥ عياري .

ثم يضاف إلى الأنابيب الأربعة بعد ذلك ١,٢ مل بيكربونات صوديوم ٠,٥ عياري ، ثم ١ مل أمينو أنتي بيرين + ١ مل حديدي سيانيد بوتاسيوم ، مع الرج عقب كل إضافة ، فيظهر لون بني محمر ، تقدركثافته الضوئية على ٥١٠ نانومتر .

يحسب نشاط إنزيم الفوسفاتاز القاعدي من تركيز الفينول مجم المتحرر في ١٥ دقيقة من المعادلة :

$$\frac{\text{قراءة العينة} - \text{قراءة المقارنة}}{\text{قراءة المحلول القياسي} - \text{قراءة البلانك}} \times ١٠ = \text{وحدات كينج أرمستروغ لكل ١٠٠ مل سيرم}$$

حيث إن وحدة King Aarmstrong عبارة عن إنتاج ١ مجم فينول في ١٥ دقيقة .

النشاط الطبيعي لهذا الإنزيم في السيرم في حدود ٣ - ١٣ وحدة كينج أرمستروغ لكل ١٠٠ مل . النشاط يزيد في الأعمار الأصغر ، وكذلك في حالة الحمل المتأخر ، وفي حالات مرضية متعلقة بالعظام ، وبالجهاز الكبدي الصفراوي ، وزيادة نشاط الثيرويد . ويؤدي الإسهال إلى إعاقة امتصاص ڤيتامين D والكالسيوم فيؤدي إلى تغييرات عظمية وزيادة نشاط هذا الإنزيم في السيرم .

٧ - إنزيم الفوسفاتاز الحامضي :

هو نفس أساس التقدير لإنزيم الفوسفاتاز القاعدي ، فيما عدا أنه يستخدم هنا محلول منظم حامضي بإذابة ٢٩,٤١ جم سيترات صوديوم في ٠,٢ عياري حمض هيدروكلوريك حتى ٥٠٠ مل . وباقي المحاليل كما هي وخطوات التقدير كذلك ، فيما عدا زيادة فترة

التحضين إلى ٦٠ دقيقة بدلاً من ١٥ دقيقة . ويجرى حساب النشاط الإنزيمي بنفس الطريقة، حيث إن وحدة نشاط إنزيم الفوسفاتاز الحامضي تعرف بأنها تكافوء تحرير ١ مجم ٪ فينول خلال ساعة تحضين على PH ٥ ، وهي وحدة كينج أرمستروغ (وهي ضعف قيمة وحدة الفوسفات التي تكافوء تحرير ١ مجم ٪ فوسفات غير عضوي في ساعة تحضين علىPH ٥) .

ويفيد تقدير نشاط هذا الإنزيم في حالة ورم البروستاتا الخبيث Malignant prostate التي يصاحبها ارتفاع في نشاط الفوسفاتاز الحامضي .

٨ - إنزيم الأميلاز :

يتأثر نشاط البنكرياس ربما لوجود ما يعيق تدفق العصير البنكرياسي ، أو ما يدهور النسيج الغدي ، أو كلاهما ، مما يؤثر على كمية إنزيمات البنكرياس في الدم بالزيادة ، أي أن اضطرابات البنكرياس تكون مصحوبة بزيادة نشاط الأميلاز والليباز في السيرم .

ولتقدير الأميلاز يوضع في أنبوبتين ٥ مل محلول نشا (١,٥ جم نشا ذائب + ٥ مل ماء يغلي ، وأثناء الغليان يضاف ماء لإكمال الحجم إلى ١٠٠ مل ، ويكمل للغليان ولا يستمر فيه ، برد ورشح على صوف زجاجي ، واحفظ في ثلاجة) + ٢ مل محلول كلوريد صوديوم (١ ٪) . وفي إحدى الأنبوبتين (عينة) ضع ١ مل سيرم ، واخلط جيداً ، وحضن الأنبوبتين على ٣٧م لمدة ١٠ دقائق . أضف ٣ مل ماء + ٨ مل حمض كبريتيك ٠,٠٨٥ عياري لكل أنبوبة . أضف ١ مل سيرم لثاني أنبوبة (مقارنة) واخلط جيداً . أضف ١ مل تنجستات صوديوم (١٠ ٪) لكل أنبوبة ، اخلط واترك عدة دقائق لتمام الترسيب . رشح وقدر الجلوكوز في ٢ مل من كل راشح .

احسب نشاط الأميلاز كوحدات سوموجي Somogyi units / ١٠٠ مل سيرم = (مجم ٪ جلوكوز في العينة — مجم ٪ جلوكوز في المقارنة) × ٢ .

وقد ترجع اضطرابات البنكرياس لالتهابات الزوائد الأعورية ، والانسدادات الصفراوية ، أو انتفاخ البنكرياس ، أو البنكرياس الكبدي (كما في حالة السرطان) ؛ فقد لوحظ زيادة نشاط الإنزيم في حالة التهاب الزائدة الأعورية بفعل السموم البكتيرية .

وبتقدير نشاط الأميلاز في البول يعكس أيضاً التغييرات في أميلاز السيرم ، طالما كانت الكلى تعمل طبيعياً ، بينما في أمراض الكلى قد يرتفع نشاط أميلاز السيرم ، وينخفض أميلاز البول . ويزيد نشاط الإنزيم في كل من البول والسيرم في حالة التهاب البنكرياس الحاد ، بينما لا يظهر هذا الارتفاع في مرض البنكرياس المزمن . وقد يزيد أميلاز السيرم في أمراض باطنية مثل انسداد الأمعاء ، والتهاب البريتون الحاد ، وقرحة المعدة . وقد تنخفض أنشطة الأميلاز في كل من السيرم والبول في وجود أمراض الكبد .

ولزيادة الإيضاح يستعان بالمراجع التالية :

- Henry , R. J. et al (1974) Clinical Chemistry Principles and Technics, 2 nd Ed., Harper & Row, N. Y .

- Lister, D. & Gregory, N. G. (1978) BSAP Occasional Publication No. 1 .

- Merck , E. (1974) Klinisches Labor. 12 . Auflage, Merck, Darmstadt .

- Paglia, D. E. & Valentine , W. N. (1967) J. Lab & Clin . path., 28 : 56 .

- Reitman, S. & Frankel, S. (1957) Am. J. Clin. Med., 76 : 158 .

- Soliman, M. K. & Abd ElMoty, I. (1976) A modern Approach to Veterinary Clinical & Laboratory Diagnosis . The scientific Book Centre, Cairo .

- The Feeding Stuffs (Sampling and Analysis) Regulations (1982). Agriculture 1982 No. 1144 . Her Majestyas Stationery Office, London

- Varley , H. (1978) Practical Clinical Biochemistry. 4 th Ed. Arnold - Heinemann , India .

- Wells, B. B. (1962) Clinical pathology. 3 rd. Ed. Saunder, philadelphia & London .

- Wootton, I. O. P. (1974) Microanalysis in Medical Biocehemistry 5 th Ed., Churchill , London .

الفصل السادس

الڤيتامينات

تتعدد طرق الڤيتامينات ، وتتوقف دقتها على ظروف التقدير . وقد يكون التقدير بقياس نمو الحيوان ، أو استجابته للعلاج من أعراض نقص الڤيتامين باختفاء المرض ، وذلك بتغذية مجموعتين من الحيوانات إحداها على عليقة ذات قدر معلوم من الڤيتامين ، والأخرى على عليقة خالية الڤيتامين ، وتسمى هذه الطريقة بالطريقة الحيوية Animal (or biological) assay method .

أو يجرى التقدير كما سبق لكن على أحياء دقيقة (بدلاً من حيوانات التجارب) ، أهمها بكتيريا Lactobacillus arabinosus ، بتنميتها في أنابيب بعضها يشمل مستخلصات مادة العلف ، والبعض الآخر يشمل تركيزات متدرجة من الڤيتامين المدروس . فزيادة نمو البكتريا تقدر من زيادة إنتاجها لحمض اللاكتيك (يقدر بالتنقيط) ، وبالتالي لخفضها لرقم PH ، وتتعكر البيئة بزيادة نموها ، فيقدر إما الحموضة ، أو PH ، أو العكارة وكلها تتناسب طردياً مع مقدار الڤيتامين في البيئة ، وتسمى هذه الطريقة بالطريقة الميكروبيولوچية Microbiological Assay Method .

أو يقدر بقياس امتصاص الضوء ، بتقدير أقصى امتصاص ، عند طول موجة يتناسب ولون مستخلص الڤيتامين ، ويرسم لها منحنى امتصاص ، أو قد يقدر للڤيتامين الوميض الفلوري Fluorescence إن كانت له هذه الخاصية ، وتسمى هذه الطريقة بالطريقة الطبيعية الكيماوية Physicochemical assay method ، وفيها يستخلص الڤيتامين ، لتقدير لون المستخلص المعامل بدليل لوني ، لقياس اللون كهروضوئيا .

كذلك هناك طرق فسيولوچية Physiological Assay Methods بقياس المفرز من الڤيتامين في البول ، بعد معرفة المستهلك أساساً لتقدير الاستفادة من الڤيتامين availability والتقدير قد يكون طبيعيا كيماويا أو ميكروبيا أو كيماويا للڤيتامين ، فهي طريقة مضاعفة . والطرق الكيماوية Chemical methods هي أكثر الطرق شيوعاً ، وفيها تستخدم تفاعلات نوعية متخصصة لكل ڤيتامين ، تمكن من التقدير الكمي سواء باستخدام Colorometer ، أو بالتنقيط باستخدام جواهر مؤكسدة ، أو بتحويل الڤيتامين لمشتق آخر له فورسنس . ولتلاشي أثر تداخلات الشوائب بالعينة ، يجرى عمل تجربة خالية blank ، أو قد يضاف قدر معلوم من الڤيتامين للعينة ، ويعاد التقدير ، أو أن ينزع الڤيتامين من العينة ويعاد التقدير

وعادة يفضل تقدير الفيتامين بأكثر من طريقة للتأكد من النتائج .

فيتامين B_1 (ثيامين Thiamin أو أنيورين Aneurine) :

لمعرفة احتياجات الإنسان أو الحيوان من فيتامين B1 يحتاج الإنسان إلى تحليل الثيامين وقد تم تطوير طريقة لتقدير الثيامين روتينيا وبثبات في كافة المواد ، سواء أغذية أو أعلاف أو مواد بيولوجية (كالأنسجة ، البول ، محتويات الأمعاء ، الروث) .

وتتم التنقية الأولية على أكمل وجه باستخدام التبادل الكاتيوني ضعيف الحامضية (Amberlite CG50) ذي نواة من أكريل أميد Acrylamid ، وهو سهل الحصول عليه ، وفعّال في أثره التنقوي للمواد التي يتم تحليلها . وكمادة مؤكسدة فقد استخدم Bromcyan أو Potassium Ferricyanid .

وفي عمل blank أو التقدير الخالي فإنه يستخدم كلوريد حامض السلفونيك ـ بنزول لإعاقة الثيامين ، أو يستخدم قلوي لتحطيم الثيامين ثم الأكسدة بالبرومسيان Bromcyan .

الأجهزة المستخدمة :

أوتوكلاف صغير ، أعمدة كروماتوجرافي ١٥٠×٦ م بأنابيب شعرية ٣٠×١م واحتياطي ١٠٠×٣٠م ، فلوروميتر للقياس بانطفاء Extincion ٣٧٨ نانومتر ، وانبعاث Emission ٤٣٠ نانومتر .

الدلائل :

كلها نقية للتحليل ، مع عمل المحاليل بالماء المقطر .

حفظ العينة :

تحفظ العينة في محاليل ٠,٨ أو ٠,٤ أو ٠,٢ عياري حامض كبريتيك، ثم تخلط للتجانس ٢٠ ثانية ، ويقدر الحجم من الحامض ، أو الوزن من العينة بالقدر الذي يسمح بتحرير المحلول المتجانس وجعله سائلاً ، مع حفظ التركيز النهائي للحامض حوالي ٠,٢ عياري . وفيما يلي أمثلة لذلك :

٩٠ جم عينة للتحليل + ٣٠ جم حامض كبريتيك ٠,٨ عياري (للشربة ، عصير ، لبن ، بول) .

٦٠ جم عينة للتحليل + ٦٠ جم حامض كبريتيك ٠,٤ عياري (للحم ، خضر ، فاكهة) .

٣٠ جم عينة للتحليل + ٩٠ جم حامض كبريتيك ٠,٢ عياري (خبز ، دقيق ، مواد علف ، روث) .

ويمكن حفظ العينة المتجانسة بهذا الشكل حتى ٣ شهور على -٢٠°م .

إجراء التحليل :

تستخرج العينة المحفوظة بالتجميد لحرارة الغرفة ، وتخلط للتجانس لفترات قصيرة عدة مرات ، ثم يؤخذ منها عينة مناسبة الوزن في دورق معياري سعة ١٠٠ مل (تحتوي تركيزاً من الثيامين حوالي ٣ـ١٢ ميكروجرام / عينة) ، وتكمل بحمض الكبريتيك ٠,٢ عياري حتى يصل الوزن الكلي للعينة ٤٠ جم ، ويضاف على كل عينة ٠,٢ مل زيت برافين ، وذلك لتجنب الرغاوي بالمعاملة الحرارية . توضع العينات في الأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة على ١٢٠°م ، $1\ Kp/Cm^2$.

التحليل الإنزيمي Enzymatic hydrolysis :

بعد برودة العينة إلى حوالي ٣٥-٤٠°م يضبط حموضتها PH ٤,٠ - ٤,٥ بالرج ، ويضاف حوالي ٥ مل محلول ٢ ، ٥ ن - خلات صوديوم ، ويضاف بالماصة ٥ مل معلق الإنزيم ١٠٪ (Clara - Diastase) ، وتحضن في ظلام على ٤٥°م لمدة ٢٠ دقيقة في حمام مائي . برّد إلى حرارة الغرفة ، وبالماء حتى ١٠٠ مل أكمل الدورق . اخلط العينة جيداً ، ثم رشحها على ورق ترشيح متوسط الصلابة ، ويسكب أول ١٠ مل من الراشح (بالترشيح تزال الأجزاء الجرشة والدهون من المستخلص) .

يمكن إجراء خطوة تنقية ثانية لإزالة البروتين والنشا باستخدام الكحول .

التنقية المبدئية للمستخلص على المبادل الأيوني (Amberlite) :

قطر حبيباته ٠,٠٨ - ٠,١٥ م ، طول العمود ٧ سم وقطره الداخلي ٦ م ، سرعةمرور المذيب ١٥ - ٢٥ نقطة / دقيقة ، تنظم بضغط القطن في الأنبوبة الشعرية قبل ملء العمود بالمادة المالئة (Amberlite) ، ينشط المبادل الأيوني بـ ٥٠ مل حامض هيدروكلوريك عياري ثم يعادل بالماء . بالماصة يؤخذ ٢٠ مل من راشح العينة ، وينقل للعمود ، ثم يغسل العمود من الشوائب بمقدار ٢٥ مل ماء (وتهمل هذه الكمية) . يغسل الثيامين بحمض الهيدروكلوريك ٠,١٥ عياري (مرة بـ ١٠ مل ثم مرة بـ ١٥ مل) من العمود . للأكسدة بالبرومسيان يوضع الغسول في دورق معياري سعة ٢٥ مل ، وللأكسدة بحديدي سيانيد بوتاسيوم يوضع الغسول في دورق معياري سعة ٥٠ مل ، وفي كلا الحالتين يكمل بحمض الهيدروكلوريك ٠,١٥ عياري للعلامة .

الأكسدة والاستخلاص : للأكسدة بالبرومسيان Bromcyan يؤخذ من الغسول ٨ مل في ثلاثة أنابيب سعة ٤٠ مل للطرد المركزي (منها اثنان كتقدير مزدوج والثالثة كعينة خاوية Blank) ، وتخلط بالهز مع مراعاة الترتيب والزمن كالتالي :

	أكسدة الثيوكروم	العينة الخاوية
العينة	٨ مل	٨ مل
٥،٢ ن - خلات صوديوم	٠,٥ مل	٠,٥ مل
برومسيان (٣ جم/١٠٠ مل ماء)	٣ مل وانتظر ١٠ ثوان	—
هيدروكسيد صوديوم (٥٠جم/١٠٠مل ماء)	٢ مل وانتظر ١٠ ثوان	٢ مل وانتظر ٣٠ ثانية
برومسيان (٣ جم/١٠٠ مل ماء)	—	٣ مل وانتظر ٣٠ ثانية
كلوريد صوديوم	٣ جم	٣ جم
٢ - بيوتانول	٦ مل	٦ مل
رج شديد	٢ دقيقة	٢ دقيقة

وللمعادلة بحديدي سيانيد بوتاسيوم يقسم الغسول (٥٠ مل) إلى جزئين :

١ - للأكسدة بالثيوكروم (عينة عادية) .

٢ - للعينة الخاوية يعاق الثيامين ببنزول سلفونيك أسد كلوريد .

ولخلط طبقات المحاليل جيداً توضع في دوارق مخروطية بنية اللون سعة ١٠٠ مل بغطاء، وتوضع على مقلبات مغناطيسية ، وتراعى الأزمنة كالتالي :

	أكسدة الثيوكروم	العينة الخاوية
العينة	٢٥ مل	٢٥ مل
٢ - بيوتانول (من سحاحة)	١٥ مل	١٥ مل
هيدروكسيد صوديوم (٥٠جم/١٠٠مل ماء)	٣ مل وانتظر ١٥ ثانية	٣ مل وانتظر ١٥ ثانية
بنزول سلفونيك أسد كلوريد	—	٣ مل وانتظر ٤٥ ثانية
محلول حديدي سيانيد بوتاسيوم (٥ جم/١٠٠ مل ماء)	٠,٦٥ مل وانتظر ٦٠ ثانية	٠,٦٥ مل وانتظر ٦٠ ثانية
كلوريد صوديوم	٦ جم	٦ جم
على أعلى سرعة للتقليب مع سد الغطاء	٦٠ ثانية	٦٠ ثانية

عقب عملية الأكسدة سواء بالبرومسيان ، أو الحديدي سيانيد بوتاسيوم يتم طرد العينة مركزيا ، وينقل من الطبقة العليا ٢ مل إلى خلية Cuvitte الفلوروميتر Fluorometer ، مع إضافة ٠,١ مل إيثانول ، والخلط ، والقياس فلورومتريا .

القياس فلورومتريا Fluorometric Measurement :

يضبط الجهاز بكبريتات الشينين Chininsulfate (١ ميكروجرام / مل في ٠,١ عياري حمض كبريتيك) على الانطفاء .(ext) ٣٥٠ نانومتر ، والانبعاث ٤٣٠ نانومتر (.emi) .

المنحنى القياسي Standard curve :

يجرى الأداء كاملا على محلول قياسي من ثيامين كلوريد - هيدروكلوريد (٣ ميكروجرام / مل في ٠,٢ عياري حمض كبريتيك) بأخذ ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ مل من هذا المحلول (تعادل ٣ ، ٦ ، ٩ ، ١٢ ميكروجرام ڤيتامين B_1 / عينة) .

تخصم القيمة المقاسة فلورسنتيا للعينة الخاوية من قيمة العينات القياسية ، ثم توقع نقط للعلاقة ما بين تركيز الڤيتامين وقراءته فلورسنتيا ، ويرسم المنحنى القياسي من هذه النقط ويستخدم لتقييم العينات المحللة .

ملاحظات :

يلاحظ في التحليل المائي بحمض الكبريتيك ٠,٢ عياري أن قيمة PH أقل من ٢ وأنه لفصل الفوسفات يستخدم مزيد من مستحضر الإنزيمات ، مخلوط الإنزيمات يحلل كذلك النشا وبذلك يسهل الترشيح . في عينات البول يمكن الاستغناء عن التحليل المائي لوجود الڤيتامين في صورة حرة ، ولكن يلزم التنقية من الشوائب بالبيوتانول قبل الأكسدة ، وذلك على المبادل الأيوني . الأعمدة المستخدمة يفضل عدم إعادة تنشيطها ، بل تستخدم مرة واحدة . دقة هذه الطريقة في اكتشاف الڤيتامين ما بين ٩٤ - ١٠٠٪ والنقص عن ذلك يرجع لنقص التنقية مما يعيق الأكسدة بالبرومسيان لإنتاج الثيوكروم فينخفض قيمة المكتشف من الڤيتامين .

٢ - ڤيتامين B_2 (الريبوفلاڤين) :

١ - زن عينة (١٠ جم) تطحن مع ١٠ جم كبريتات صوديوم لامائية ويتم استخلاصها بمقدار ٧٠ مل محلولاً منظماً من الخلات ٠,٥ مولر PH ١,٧ لمدة ساعتين على ٦٠ْم ، ثم أضف ٦٠ مل ماء + ١٠ مل حمض ثلاثي كلوروخليك وسخن ٢٠ دقيقة على حمام مائي حتى تتجمع البروتينات .

٢ - اطرد مركزيا واغسل بمقدار ٢٠ مل محلولاً منظما ، واجمع المستخلصات ورشحها .

٣ ـ نقي المستخلص على عمود كروماتوجرافي من ٣ جم فلوريسيل مغسول بالماء الساخن والمحلول المنظم البارد ، وطور الريبوفلافين من العمود بغسيله بمقدار ٤٠ مل محلول بيريدين ، الذي يخفف بضعف حجمه من الماء لقياس الفلورسنت في مدى من طول الموجة ٤٠٠ - ٦٠٠ نانومتر .

٤ ـ يجرى ما سبق على محلول قياسي معلوم التركيز .

٥ ـ قس الكثافة الضوئية لمقارنة تحتوي ٥ مل غسولاً + ٢ مل محلولا ، ٠,١ مولر ملح صوديوم EDTA + ١٠ مل ماء . بعد تشعيع المحلول بضوء شديد (٢٠٠ وات) على مسافة ٢٠ سم لمدة ٣٠ دقيقة .

٦ ـ يتم الحساب لتركيز الريبوفلافين في العينة بالميكروجرام لكل جرام عينة بمعلومية تركيز وقراءة المحلول القياسي ضد المقارنة .

٣ ـ ڤيتامين B_6 :

يتم تقدير ڤيتامينات ب٦ (بيريدوكسال ، بيريدوكسين ، بيريدوكسي أمين) بواسطة الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء HPLC كالتالي :

١ ـ يذاب ڤيتامين ب٦ في الماء ليحتوي المحلول القياسي على ٠,١ مجم (١٠٠ ميكروجرام) لكل مل من كل مركب من الڤيتامين على حدة ، ومحلول آخر يحتوي المركبات الڤيتامينية الثلاثة بنسب ١/١/١ . ويحقن الجهاز بمقدار ٢٠ ميكروليتر من كل من المحاليل الأربعة السابقة .

٢ ـ تستخلص العينات بطحنها مع كمية مساوية وزناً من الإيثانول ٩٥٪ ، وينقل من المستخلص ٢٥ مل إلى دورق معياري بني اللون سعة ١٠٠ مل .

٣ ـ يجرى عمل مقارنة على ٢٥ مل من الماء .

٤ ـ يضاف على مستخلص العينات والمقارنة ٦٠ مل محلول حمض هيدروكلوريك (٠,١ عياري) ، ويسخن على (٩٧°م) لمدة ساعة . برد وأضف ٥ مل محلول ٦٪ من كل من الدياستاز والببسين المذابين في خلات صوديوم ٢,٥ عياري ، واخلط ثم حضن ١٦ ساعة (ليلة) على ٣٧°م (أو لمدة ساعتين على ٤٧°م) برد وأكمل إلى علامة ١٠٠ مل ثم رشح .

٥ ـ قد تنقى العينات من الشوائب بتمرير مستخلصاتها على عمود كروماتوجرافي مليء بالدويكس Dowex AG 50 w x 4 or AG 50 w x 8 ، بنقل ٢٥ مل من المستخلص المرشح إلى أعمدة الكروماتوجرافي المحتوية على ٧,٥ جم من المبادلات المذكورة ، ثم يغسل العمود بمقدار ٢٠٠ مل ماء مقطراً ، ويهمل الغسول ثم تغسل الڤيتامينات بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم ٠,٠٥ عياري ، ويجمع من هذا الغسول أحجام كل منها ٢٥ مل ،

ويتم تحميض كل هذه الحجوم بواسطة حمض الفوسفوريك ٢ عياري إلى PH ٦ .

٦ ـ يحقن جهاز الكروماتوجرافي بمقدار ٢٠ ميكروليتر من كل من الحجوم الأخيرة في خطوة رقم (٥) . غالباً يتم الحصول على ڤيتامين ب٦ كاملاً من عمود الكروماتوجرافي في الثلاث حجوم الأولى (٣×٢٥ مل) من غسول البوتاسا الكاوية .

٧ ـ يمكن التأكد من عدم تلوث عمود جهاز الكروماتوجرافي السائل بالڤيتامين من قبل ، بحقنه بجرعة من فوسفات البوتاسيوم أحادي القاعدة PH ٤,٣٥ وعيارية ٠,١ وذلك قبل استخدامه بحوالي ٢٤ ساعة . وأفضل حرارة لعمود الجهاز أثناء التطوير هي ٤٠°م ، بمعدل مرور الطور المتحرك (المذيب) ٤٥ مل / ساعة ، ومحلول التطوير من فوسفات البوتاسيوم أحادية القاعدة ٠,١ عياري PH ٤,٣٥ . ويتم الامتصاص على طول موجة ٢١٠ نانومتر .

تقدير مجموعة ڤيتامين ب٦ بالكروماتوجرافي رقيق الطبقات TLC :

استخدم الكروماتوجرافي رقيق الطبقات في تقدير مجموعة البيريدوكسين في المستحضرات الصيدلانية ، وذلك بتحويل البيريدوكسال غير الثابت إلى مركب ثابت من أسيتيل ميثيل ، بالغليان في بيئة من الميثانول ، فيظهر الميثيل أسيتال كبقعة منفردة على الرقيقة (سليكاجيل) ، التي تطور في أسيتون ، ثم في مخلوط من أسيتون / ديوكسان / أمونيا (٤,٥/٤,٥/١) . ويظهر البيريدوكسال بفلورسنت أخضر مصفر ، وبالرش بمحلول ٠,٠٤٪ من دي كلوروكينون كلورو أيميد في كحول ميثانول فيظهر البيريدوكسال والبيريدوكسامين كبقع شديدة الزرقة . وبعد الإظهار للبقع على طول موجة ٢٥٤ نانومتر يمكن كشط البقع وتطويرها ، أو استخلاصها بالأحماض المعدنية المخففة للتقدير الكمي على سبكترو فوتومتر على ٢٦١ نانومتر . وعادة تستخلص العينات بالميثانول في ماء .

تقدير البيريدوكسول Pyridoxol :

١ ـ زن ٣ جم عينة في كأس ، واستخلصها بالداي إيثيل إيثير (٢٠ مل) نصف ساعة مع استمرار التقليب . اطرد مركزيا ، واغسل الراسب بمقدار ٢٥ مل من الإيثير . اجمع المستخلصات وبخرها لحوالي ٢٠ مل ٦٠°م تحت تفريغ . رشح وخفف إلى حجم معلوم .

٢ ـ خذ ٢ مل من المستخلص + ٨ مل ماء + ٣ مل محلول منظم فوسفات PH ٧ + ١ مل دليلا (٠,١ جم ن ـ ن دى إيثيل ـ بارا ـ فينيلين دي أمين كبريتات في ١٠٠ مل ماء)+ ١,٥ مل محلول (٠,١ جم حديدو سيانيد بوتاسيوم في ١٠ مل ماء) في قمع فصل ، ورج ثم أضف ١٠ مل بنزين ، ورج ثانية لمدة دقيقة . خذ طبقة البنزين واطردها مركزيا .

٣ ـ أجر ما سبق على محلول قياسي (١٠ مجم بيريدوكسول هيدروكلوريد في ١٠٠ مل ماء) وكذلك على مقارنة برج ٥ مل بنزين مع محلول حمض بوريك ٣٪ واطرد مركزيا للطبقة عديمة اللون تقريباً .

٤ ـ قدر الكثافة الضوئية على ٦٠٦ نانومتر ضد بنزين .

٤ ـ ڤيتامين B_{12} :

يتم تقديره باستخلاصه بمذيب عضوي ، وفصله بالتبادل الأيوني الكروماتوجرافي ، ثم تقديره على سبكتروفوتومتر كالتالي :

١ ـ زن عينة تحتوي تقريباً على ١٠٠-٣٠٠ ميكروجرام ڤيتامين ، ويضاف إليها خمسة أضعاف وزنها أسيتون (٨٥٪ في ٠,١ مولر حمض هيدروكلوريك) وتترك ٢٠ دقيقة، ثم ترشح ويعامل الراسب بحجم مساو من ميثانول ٥٠٪ + ٢ مل سيانيد بوتاسيوم واضبط PH بحمض السيتريك (٣٠ جم حمض سيتريك + ٦٥ جم سيترات صوديوم في اللتر) إلى PH ٧,٥ .

٢ ـ سخن الخليط إلى ٥٠ْم على حمام مائي ، ثم اتركه ساعة ، ثم حمضه بحمض السيتريك السابق إلى PH ٤ في خزانة غازات للحذر من حمض الهيدروسيانيك ، وبعد الطرد المركزي يغسل الراسب بمحلول الاستخلاص ، واجمع المستخلصين المائيين .

٣ ـ بخر الميثانول تحت تفريغ ، ثم استخلص المتبقيات بمخلوط الفينول (٢٠ مل من محلول ٥٠ جم فينول في ١٠٠ مل رابع كلوريد كربون) في قمع فصل . ويفصل المستخلص الفينولي من الطبقة المائية ، ثم يضاف ١٠ مل رابع كلوريد كربون + ٢٠ مل بيوتانول ، ويرج بشدة مع ٢٠ مل ماء .

٤ ـ ينتقل ڤيتامين ب١٢ إلى الطبقة المائية التي تطور على عمود كروماتوجرافي طول ١٠ سم مليء بالمبادل الأيوني Amberlite Xe 97 (الذي يعلق في ماء عدة مرات ، ويصرف هذا الماء ، ثم يضاف ٣٠ مل صودا كاوية عيارية ، ويخلطا معا بالتقليب ، وبعد ٢٠ دقيقة تزال الصودا الكاوية ، ثم يغسل المبادل الأيوني بالماء حتى يتعادل ، ثم يدفع المبادل إلى العمود ، وينشط بغسيله في العمود بالسيتريك السابق) . يحمض مستخلص العينة على العمود بالسيتريك السابق ، ويغسل بحمض الهيدروكلوريك ٠,١ عياري ثم بالأسيتون ٥٠ مل (٨٥٪ في هيدروكلوريك ٠,١ عياري) ثم بالهيدروكلوريك ٠,١ عياري حتى تظهر منطقة وردية (قرنفلية) هي المدمصة للڤيتامين وذلك في قمة العمود . يغسل الڤيتامين برابع هيدروفيوران (٦٠٪ في حمض هيدروكلوريك ٠,١ عياري) وتلاحظ حركة المنطقة القرنفلية .

٥ ـ يجمع حوالي ٢٠ مل من الغسول المحتوى على الڤيتامين ، ويبخر رابع هيدروفيوران

تحت تفريغ ، ويطرد الباقي مركزياً إذا ظهرت عكارة ، وينقل المحلول إلى دورق معياري ١٠ مل .

٦ ـ قدر الكثافة الضوئية ضد ماء ، وتكون نسبة قراءة امتصاص الفيتامين عند ٣٦١ ، ٥٤٨ نانومتر حوالي ٣ - ٣,٥ فيكون تركيز الفيتامين بالميكروجرام =

$$\frac{\text{الامتصاص عند ٣٦١ نانومتر} \times ١٠٠}{٠,٢٠٧}$$

حيث المقام (٠,٢٠٧) عبارة عن امتصاص ١٠٠ ميكروجرام فيتامين / ١٠ مل محلولاً قياسيا فيبقى فقط تعديل التركيز حسب وزن العينة ومحتوى العينة في الحجم المقدر (١٠ مل) .

٥ ـ حمض الفوليك أو حمض بتيرويل جلوتاميك :

Folic Acid (Pteroyl glutamic acid)

١ ـ تؤخذ وزنة عينة تحتوي ١٠٠ - ٢٠٠ ميكروجرام حمض فوليك ، وتستخلص بمحلول منظم فوسفات PH ٨ (٥جم فوسفات صوديوم ثنائية القاعدة في ١٠٠مل ماء) ، ويطرد المستخلص مركزياً .

٢ ـ يؤخذ حجم من المستخلص يحتوي تقريباً ٥-١٠ ميكروجرام حمض فوليك ، ويضبط PH إلى ٤ بمحلول منظم خلات ٢,٥ مولر (٥٠٠ مل حمض خليك ٥ عياري + ١٠٠ مل هيدروكسيد صوديوم ٥ مولر ، وتخفف إلى لتر بالماء) ويضاف بالتنقيط محلول برمنجنات بوتاسيوم ٤ ٪ حتى نقطة اختفاء اللون .

٣ ـ بعد ٥ دقائق تحطم الزيادة من البرمنجنات بإضافة ٠,١ مل فوق أكسيد هيدروچين ٣ ٪ ، وانقل المحلول إلى عمود فلوريسيل (٥٠٠ جم تخلط في لترين من محلول رابع بورات صوديوم ٤ ٪ ، واغل نصف ساعة ، ثم اهمل رابع بورات الصوديوم ، وكرر مرة أخرى ، ثم اغسل بالماء المقطر ، علق مرة ثانية في لترين من محلول منظم خلات ٠,٥ مولر ، واغل نصف ساعة ، ثم اغسل بمحلول منظم ٠,٢٥ مولر خلات ثم جفف هوائيا) . اغسل العمود مرتين ، في كل مرة بمقدار ١٠ مل محلول منظم خلات ٢,٥ مولر ، ثم طور ٤ مرات × ٥ مل محلول منظم رابع بورات . يضبط PH المستخلص بحمض الهيدروكلوريك ٢ مولر إلى ٤ - ٤,٥ ، ثم خفف بالماء إلى ٢٥ مل .

٤ ـ قدر الكثافة الضوئية على ٤٧٠ نانومتر ، ثم أضف ٠,١ مل هيدروكسيد صوديوم ٤٠ ٪ لكل ١٠ مل ، وكرر القياس .

٥ ـ كرر ما سبق على محلول قياسي من حمض الفوليك (٠,١ ميكروجرام / مل) ، وبهذه المقارنة مع ١٠ مل مستخلص محلول قياسي (من العمود الكروماتوجرافي) يمكن

حساب تركيز حمض الفوليك بالميكروجرام في ١٠ مل مستخلص = $\frac{F_v}{F_s}$ حيث F_v كثافة فلورسنت العينة ، F_s كثافة فلورسنت المحلول القياسي .

٦ ـ كالسيوم بانتوثينات Calcium Pantothenate :

١ ـ عد عمود كروماتوجرافي من كل من المبادلات الأنيونية والكاتيونية (ارتفاع كل منهما ٥ سم ، ويفصلهما سدادة من الصوف الزجاجي) ، ويستخدم المبادل الكاتيوني مثل Dowex 50W - X4 ، كما يستخدم الفلوريسيل لعزل الريبوفلافين . يغسل العمود قبل استخدامه بحمض هيدروكلوريك ١,٠ مولر (١٠ مل) ، ثم بالماء (١٠٠ مل) .

٢ ـ تستخلص العينة بكحول بنزيل ، ويؤخذ من المستخلص ١٠ مل تحتوي تقريباً ١,٢ مجم كالسيوم بانتوثينات ، وتطرد مركزيا مع ١٣ مجم فوسفات صوديوم أحادية القاعدة . رج الأنبوبة ١٥ دقيقة ، ثم أضف ٢٠ مل كحول بنزيل ورج ١٥ دقيقة .

٣ ـ تعمل تجربة خاوية بأخذ ١٥مل من المستخلص الكحولي البنزيلي+ ١٠مل تولوين+ ١٢ مل ماء ، ورج بشدة ١٥ دقيقة واطرد مركزيا .

٤ ـ يؤخذ ١٠ مل من الطبقة المائية (خطوتا رقم ٢ ، رقم ٣) ، وتوضع كل منها على عمود، ويجمع الناتج من تطوير العمود في دوارق ١٠٠ مل، يغسل العمود ٦ مرات × ٥ مل ماء .

٥ ـ أضف ٢٥ مل حمض بوريك (١٠٠جم / ٢ لتر)+ ٨ مل هيدروكسيد صوديوم ٣,٥ مولر إلى الغسول ، وسخن على ١٠٠°م لمدة ساعة للتحلل المائي . برد واضبط PH إلى ٨ بإضافة ٩ مل حمض هيدروكلوريك ٣ مولر ، ثم أضف ٤مل محلول نافثوكينون (٢٥٠ مجم ١-٢- نافثوكينون -٤- سلفونات / ٥٠ مل ماء) ، واخلط وسخن على ١٠٠°م ، ثم برد في ثلج .

٦ ـ أضف إلى كل دورق ٤ مل محلول ثيوكبريتات (٢,٥جم / ١٠٠مل) + ٤ مل دليل فورمالدهيد (٣ أجزاء حمض هيدروكلوريك ٦ مولر + ٤ أجزاء حمض خليك ثلجي + ٤ أجزاء فورمالدهيد ٠,٦ مولر) ، وخفف إلى ١٠٠ مل .

٧ ـ بعد ١٠ دقائق ، قدر الامتصاص على ٤٦٥ نانومتر ، مع المقارنة بمحلول قياسي (٢,٥ جم / ١٠٠ مل) ، أجر عليه نفس الخطوات ، وضد مقارنة من ٤ مل ماء بدلاً من محلول النافثوكينون إلى مستخلص العينة ، واستنتج تركيز بانتوثينات الكالسيوم بالمليجرام في ١٠ مل مستخلص =

$$\left(\frac{\text{امتصاص العينة – امتصاص المقارنة}}{\text{امتصاص المحلول القياسي}} \right) \times \text{كمية الفيتامين القياسي بالمليجرام}$$

٧ ـ الكولين Choline :

١ ـ زن ٢ جم عينة ، واخلطها مع ٢٠ مل إيثير بترولي ، واسحب المحلول بعد ٢٠ دقيقة ، ثم أضف ١ مل حمض هيدروكلوريك ٢٠٪ ، واستخلص ٢٠ دقيقة بالإيثانول ٨٠٪ (٢٠ مل) بالتقليب المستمر . اطرد مركزيا ، واغسل الراسب بمحلول الاستخلاص (٥ مل) ، واجمع المستخلصات ، وقطر الزيادة من الإيثانول تحت تفريغ .

٢ ـ انقل المتبقيات إلى دورق معياري ٥٠ مل ، وأكمل بالماء إلى العلامة . وخذ ٨ مل من المستخلص + ٢ مل ماء + ٥ مل فوسفات ثلاثي صوديوم مشبعة وذلك للتقدير .

٣ ـ النقل إلى القلوي قد يعكر المحلول فيطرد مركزيا ، ويضاف إلى الرائق ٥ مل محلول رينيكات (٢٪ أمونيوم رينيكات Ammonium Reineckate في ميثانول) واخلط . اتركه يستقر في ثلاجة على ٥°م لمدة ساعتين .

٤ ـ اطرد البلورات المترسبة مركزيا ،ثم اغسلها بمحلول رينيكات (٥ مل في ١٠٠ مل ماء) ، واطرد مركزياً مرة أخرى . أذب الراسب في أسيتون ، ورشح خلال صوف زجاجي إلى دورق معياري ١٠ مل ، وخفف إلى العلامة بالأسيتون .

٥ ـ يجرى ما سبق على محلول قياسي من الكولين بيتارترات في أسيتون ، وكذلك على عينة خاوية كمقارنة من دقيق الصويا منزوع الدهن . ويجرى تقدير الكثافة الضوئية على ٥٢٦ نانومتر ضد أسيتون ، مع طرح قراءة المقارنة من كل من العينة والمحلول القياسي، وعمل حساب التخفيف ووزن العينة لحساب تركيز الكولين بالمليجرام لكل جم عينة .

٨ـ ڤيتامين ج(حمض الأسكوربيك وحمض دي هيدرو أسكوربيك):

١ ـ ضع وزنة من العينة بالضبط حوالي ١٠ جم في دورق ، ثم أضف ٣٠ مل كلوروفورم (٤°م) + ٢٥ مل حمض ميتافوسفوريك (٢٠٠ جم حمض ميتافوسفوريك مطحوناً ويذاب في ماء ، وتكمل إلى ٢ لتر بالماء وتحفظ على ٤°م . هذا المحلول ثابت لمدة أسبوع) .سد الدورق ، ورج ثم اتركه ١٠–١٥ دقيقة .

٢ ـ أضف ٢٥ مل ماء ، وسد ثم رج بشدة ١٠ ثوان ، ثم اتركها ١٠–١٥ دقيقة في حمام مائي على ٢٠°م .

٣ ـ اطرد مركزياً لفصل طبقتي الماء والكلوروفورم ، حيث تؤخذ الطبقة المائية للخطوات التالية .

٤ ـ يؤخذ حجم معلوم من المستخلص المائي ، ويوضع في دورق سعة ٥٠ مل ذي سدادة ، وتخففه إلى ٤٠ مل بمخلوط متساوي الحجوم من محلول حمض ميتافوسفوريك والماء . أضف ٠,٥ – ١ مل من محلول الأكسدة الإندوفينول (٠,٥ جم صبغة ٢–٦–

دي كلوروفينول إندوفينول / ١٠٠ مل تحضر فوراً قبل الاستخدام) ، واخلط جيداً ، فينشأ لون أحمر يستمر على الأقل ١٥ دقيقة .

٥ ـ أضف حوالي ٣٠٠ مجم مادة مساعدة للترشيح ، ورج ثم رشح ، ليس من الضروري أن يكون الراشح رائقاً .

٦ ـ يؤخذ بماصة ١٠ مل من الراشح إلى أنبوبة طرد مركزي + ٢ مل محلول الهيدرازين (أذب ٢ جم من ٢-٤- دي نيتروفينيل هيدرازين في ١٠٠ مل حمض كبريتيك مخففاً (١ : ٤) ، ويحفظ بارداً لمدة لا تزيد عن أسبوع) ، واخلط ومرر في الأنبوبة بسرعة تيار من النيتروچين ، أو ثاني أكسيد الكربون ، وسد الأنبوبة واغمسها في حمام مائي (٢٠°م) ١٥ ساعة (ليلة) .

٧ ـ أضف ٣ مل ماء + ٢٠ مل مخلوط خلات إيثيل / حمض خليك ثلجي / أسيتون (٢/٢/٩٦) ، وحوالي ٨٠٠ مجم مساعدة ترشيح ، وسد ورج بشدة ٣٠ ثانية ، واطرد مركزيا .

٨ ـ انقل ١٥ مل من الرائق في دورق تقطير ، وبخر تحت تفريغ حتى تتبقى طبقة زيتية. أذب هذه المتبقيات في ٤ مل حمض كبريتيك (١ : ١) ، ورج بشدة لإذابة المتبقيات تماماً ، ثم قس الامتصاص الضوئي على طول موجة ٥٠٩ نانومتر بعد ٢٠-٣٠ دقيقة من ذوبان المتبقيات في حمض الكبريتيك ، ضد مقارنة من حمض الكبريتيك المخفف (١:١).

٩ ـ تجرى تجربة خاوية من العينة بنفس الخطوات السابقة .

١٠ـ يجرى تقدير للكثافة الضوئية لمحلول قياسي ، تم عليه نفس الخطوات كما في العينة والتجربة الخاوية .

١١ـ يعبر عن تركيز ڤيتامين (ج) في العينة بالجرام / كجم .

ملحوظة :

يحضر المحلول القياسي من حمض الأسكوربيك بإذابة ٥٠ مجم ل - حمض أسكوربيك في ٢٠ مل محلول حمض ميتافوسفوريك ، ثم يكمل إلى ١٠٠ مل بالماء ، على أن يحضر طازجاً قبل الاستخدام مباشرة .

هذا وقد يقدر الڤيتامين في مستخلص مائي للعينة يحتوي حمض أوكساليك ، أو حمض ميتافوسفوريك ، فيؤخذ ١ مل من مستخلص العينة (وكذلك من محلول قياسي)+ ٥ مل دليل (١ ٪) في حمض هيدروكلوريك ٠,١ مولر ، ويخلط ويسخن لمدة ساعة على ٥٠°م ، ثم يقدر الامتصاص الضوئي على ٣٩٥ نانومتر ضد مقارنة من ١ مل ماء بدلاً من مستخلص العينة .

ويقدر ڤيتامين ج كذلك بالمعايرة بوزن ١٠ جم عينة في كأس وتغطى بالكلوروفورم

(٣٠ مل) ، ويقلب ثم يترك يستقر نصف ساعة ، ثم يستبعد الكلوروفورم ، وتنقل العينة إلى دورق معياري ٢٥٠ مل مليء بثاني أكسيد الكربون ، ويرج ٥ دقائق مع مخلوط الاستخلاص (١٠٠ مل ميثانول تحتوي حمض أوكساليك ١,٠٪) + ٢٠ مل إيثير بترولي + ٢ مل ماء تحتوي حمض أوكساليك (٠,٪)) ، ثم يترك يستقر ويرشح ، ويهمل أول ٣٠ مل من الراشح ، بينما يجمع ١٠٠ مل تالية في دورق معياري . يؤخذ منها ٢٠ مل في دورق + ٢٠ مل محلول حمض أوكساليك ١,٠٪ مشبع بثاني أكسيد الكربون ، ويرج ثم يضاف ١,٥ مل حمض أوكساليك ٥٪ + ٢ مل خلات رصاص ١٠٪ في ماء ، ويرج ويترك ١٠ دقائق ، ثم يرشح ، ويغسل الراسب بمقدار ٢٠ مل ماء ، ويجمع المترشح، ويضبط درجة حموضته PH إلى ٣,٥ باستخدام خلات الصوديوم ٥٪ في ماء ثم نقط المحلول بصبغة ٢-٦- دي كلورو فينول - إندوفينول ١٠-٤ مولر (١٥-٢٠ مجم ملح صوديوم دي كلورو فينول إندوفينول وزن جزيئي ٢٩٠,٠٩ تذاب في ٥٠٠ مل ماء مقطراً، ويضاف إليها ١٢ مجم بيكربونات صوديوم ، وينقط منه على حمض أسكوربيك نقي لتحديد عياريته) حتى يظهر لون قرنفلي ثابت لمدة ٥ دقائق على الأقل (١ مل من هذا الدليل = ٠,٠١٧٦ مجم حمض أسكوربيك) .

ولمعايرة المحلول القياسي (٠,٠١٪ في ماء يحتوي ١,٠٪ حمض أوكساليك ويشبع بثاني أكسيد الكربون ، وهذا المحلول ثابت ليوم واحد) يؤخذ منه ٢ مل وتخفف بحمض أوكساليك ١,٠٪ إلى ٣٠ مل ، ويضبط PH إلى ٣,٥ بإضافة خلات الصوديوم ، والتنقيط بالصبغة ، ويستنتج تركيز الفيتامين بالمجم / كجم بمعلومية تركيز المحلول القياسي وحجم الصبغة المعايرة له وحجم الصبغة المعايرة للعينة .

وهذا التركيز غير مصحح للدهيدرو حمض أسكوربيك .

ولتقدير حمض الأسكوربيك في الدم يخلط حجم من البلازما حديثة الفصل عن الدم مع حجم من حمض ثلاثي كلورو خليك ، أو حمض ميتافوسفوريك . رشح أو اطرد مركزيا . اسحب ٠,٢ مل صبغة مخففة (٤٠ مجم صبغة ٢-٦- دي كلوروفينول إندوفينول في ١٠٠ مل ماء ، ١ مل = ٠,٢ مجم حمض أسكوربيك لا يستخدم بعد أسبوع من التحضير ، خفف ٥ مل إلى ٢٥ مل فيكون ١ مل = ٠,٠٤ مجم حمض أسكوربيك) إلى أنبوبة اختبار ، وعايرها بالراشح للعينة حتى يختفي اللون الأحمر ، ٠,٢مل صبغة = ٠,٠٠٨ مجم حمض أسكوربيك . تركيز حمض الأسكوربيك مجم /

$$١٠٠ \text{ مل بلازما} = \frac{٠,٠٠٨ \times ٢ \times ١٠٠}{\text{حجم الراشح للعينة المستهلك في المعايرة (مل)}}$$

إذا لم يقدر الفيتامين في الدم مباشرة عقب جمعه فتحفظ العينات بجمعها على نقطة

من سيانيد البوتاسيوم ٥ ٪ ، ونقطة من أوكسالات البوتاسيوم ٢٠ ٪ لكل ٥ مل دم .

ولتقدير فيتامين ج في البول يضاف ١٥ مل حمض خليك ثلجي إلى ١٥٠ مل بولاً طازج الجمع . تملأ سحاحة بمقدار ٥ مل من البول المحمض ، عاير ١ مل محلول صبغة (٢ : ٦- دي كلوروفينول إندوفينول) قياسي (يعادل ٠,٠٢ مجم حمض إسكوربيك) في أنبوبة اختبار مضافًا إليه نقطة حمض خليك ثلجي بالبول المحمض حتى يختفي لون الصبغة البنفسجي . يجب ألا تتعدى عملية المعايرة عن دقيقتين . فيكون تركيز حمض الأسكوربيك مجم / ١٠٠ مل بول =

$$\frac{٠,٠٢ \times ١٠٠}{\text{حجم البول المستخدم في المعايرة} \times \text{(حجم البول + حجم حمض الخليك الثلجي المضاف)}}$$

٩ ـ فيتامين أ Vitamin-A determination والكاروتين B-Carotin :

تتوقف طرق تقدير فيتامين أ ضوئيا (سبكتروفوتومتري أو فلورومتري) على قياس الفورسنس الأخضر المصفر للفيتامين .

وبنزع الماء بطريقة Anhydromethod ، وتقديره سبكتروفوتومتريا ، تعد هذه طريقة ممتازة؛ لأن الفيتامين المنزوع الماء لا ينافسه أي مركب آخر في ظهور منحناه عند نفس طول الموجة (٣٩٩ نانومتر) ، فلا يحدث بالتالي أي اختلاط للفيتامين مع الشوائب من العينة ، إذ أن طرق القياس السبكتروفوتومتري تشترط نقاء الفيتامين أو مستحضراته .

كما قد يقدر الفيتامين كروماتوجرافيا TLC ، لكن يتحطم الفيتامين في ظرف دقائق قليلة على الرقيقة الجافة للكروماتوجرافي، مما لا يمكن من استخلاص الفيتامين من الرقيقة للتقدير الكمي ، وإن كان يجرى التقييم الكمي بالتصوير للرقيقة وتقديرها ضوئيا . وفيما يلي طريقة للتقدير الكمي لفيتامين أ والكاروتين سبكتروفوتومتريا Spectrophotometric :

تقدير فيتامين أ في مواد العلف :

أساس الطريقة :

بطريقة نزع الماء يمكن الحصول على الفيتامين في صورة كحولية ، يزيد فيها رابطة مزدوجة عن الفيتامين ، ويظهر أقصى امتصاص في محلول من البنزول عند ٣٩٩ نانومتر ، ولحساب التركيز يستخدم المعامل ١٦,٤ من Specific Extinction (E) .

ويوجد الفيتامين في مواد العلف ككحول حر أو إستر . وقد يجرى عملية تصبن لمادة العلف قبل نزع الماء ، وذلك لتقدير الإستر والكحول الحر ، وإن كان التصبن يصحبه فقد في الفيتامين ما بين ٣٥ إلى ٣٨ ٪ . ولا يتأثر الكاروتين بكل هذه العمليات ، فبالتالي يمكن تقديره في المستخلص البنزولي .

ويقدر ڤيتامين أ سبكتروفوتومتريا على صورة Anhydrovitamin ، ويقدر الكاروتين كقيمة صفراء كلية باستخدام المعامل ٤,٣٧ .

في بنزول	طول الموجة التي عندها أقصى امتصاص	المعامل
انهيدروڤيتامين أ	٣٩٩ نانومتر	١٦,٤
كاروتين	٤٦٥ نانومتر	٤,٣٧

الكيماويات والمحاليل :

إيثانول ٩٩٪ ، إثير بترولي ٦٠-٨٠°م ، بنزول ، حمض هيدروكلوريك (١ : ٩ حامض: إيثانول ٩٩٪ (حجم / حجم))، ماء مقطر ، حمض أسكوربيك (٣٪ في إيثانول ٨٧٪)، كبريتيد صوديوم (٢,٣٪ في إيثانول ٨٧٪) ، صودا كاوية (١,٥ عياري في ماء)، بوتاسا كاوية (٣٢٪ في إيثانول ٨٧٪) ، هيدروكينون (٠,٥٪ في إيثانول ٩٦٪) ، كبريتات صوديوم جافة .

تحضير العينة :

العينة الصلبة بعد طحنها تصبن مباشرة ، ويفصل الڤيتامين والكاروتين من مخلوط التصبن بواسطة الإثير البترولي . العينة السائلة يرسب بروتينها بالإيثانول ، ثم يستخلص الخليط عدة مرات بالإثير البترولي ، ثم يرج ويطرد مركزيا ، وتسحب طبقة الإثير البترولي لإجراء التصبن عليها ، وترج ٣ ساعات على الأقل . بعد فصل الطبقات ، تستخلص الطبقة المائية عدة مرات بالإثير البترولي ، وتجمع طبقات المذيب العضوي . في كلتا العينتين (صلبة وسائلة) يكون الڤيتامين في صورة كحول حر .

التصبن :

حجم العينة (١٠-٣٠ جم) يتوقف على محتواها الڤيتاميني ، (الكبد والأعضاء يكفي ١ جم) . توضع العينة في زجاجة بنية اللون ذات غطاء سعة ١٥٠-٢٠٠ مل مع ٣٠ مل إثير بترولي + ٢ مل ماء مقطراً + ١٠ مل محلول هيدوركينون + ٤ مل محلول سلفيد صوديوم + ١ مل محول حمض أسكوربيك + ١٠ مل محلول بوتاسا كاوية ، وترج الزجاجة لمدة ٨-١٠ ساعات . العينات السائلة يوضع مستخلصها الإثيري البترولي مع باقي محاليل التصبن الأخرى ، وترج ٤ ساعات .

الاستخلاص :

أضف ٥٠ مل ماء مقطراً للزجاجة ، وأغلقها مباشرة ، ورج ساعة أخرى . افصل الطبقات في قمع فصل أو بالمص . يستخلص الجزء المائي عدة مرات في كل مرة ١٥ مل إثير بترولي ، ويجمع المستخلص ، ويغسل مرتين بالماء المقطر ويجفف بكبريتات الصوديوم .

نزع الماء من الفيتامين :

بخر طبقة الإثير البترولي تحت تفريغ على حمام مائي في وجود النيتروجين على ٣٥°م حتى الجفاف ، ثم أذب الراسب في ٧ مل بنزول . ٥ مل من البنزول + ٥ مل محلول هيدروكلوريك واخلط ١٥ دقيقة في ظلام . ضع المخلوط في قمع فصل ، واغسله على الترتيب مرة بالماء المقطر (٥ مل) ، ثم بالصودا الكاوية (٥ مل) ، ثم بالماء المقطر (٥ مل) . جفف الطبقة البنزولية على كبريتات صوديوم ، وانقلها للتقدير سبكتروفوتومتريا .

التقدير لفيتامين أ :

يقاس كل من الجزء المنزوع الماء ضد الجزء البنزولي الأولي الباقي بدون نزع الماء على ٣٩٩ نانومتر ، فيكون تركيز فيتامين أ هو ناتج E (Extinction) مضروباً في المعامل ١٦,٤ معبراً عنه بالوحدات الدولية / مليلتر بنزول .

تقدير الكاروتين :

الفرق في E بين الجزء المنزوع الماء والبنزول الصافي على ٤٦٥ نانومتر يعطي قيمة اللون الأصفر الكلى . البيتاكاروتين تحسب من E مضروبة في المعامل ٤,٣٧ معبراً عنها بالميكروجرام / مل بنزول .

وتجرى جميع الخطوات في معزل عن ضوء الشمس المباشر .

هذا وقد أمكن تقدير فيتامين أ حديثاً في مواد العلف باستخدام الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء HPLC . كما يمكن فصل الكاروتين وكذا الزانثوفيل على أعمدة الكروماتوجرافي وتقديرها كهروضوئيا.

تقدير فيتامين (أ) ضوئيا بحمض ثالث فلوروخليك :

١ ـ عد محلولا قياسيا متصبناً لفيتامين (أ) في كلوروفورم ، بتركيز يتراوح ما بين ٣×١٠-٦ مولر إلى ١,٢ × ١٠-٥ مولر . ضع ١,٥مل منه في خلية الأسبكتروفوتومتر + حجم مساو من حمض ثلاثي فلورو خليك بمحقن ، بحيث تضع الحمض أسفل سطح الكلوروفورم ، وبعد ١٠ ثوان قس الكثافة الضوئية على ٦١٦ نانومتر .

٢ ـ استخدم نفس الخطوات على ١,٥ مل مستلخص عينة في كلوروفورم ، أي بعد تصبين العينة ، واستخلاص الدهن في إيثير وتجفيفه ، ينقل تحت تيار نيتروچين أو هيليوم لإذابته في كلوروفورم .

٣ ـ يصلح هذا التكنيك لتقدير فيتامين (أ) والصور المتعددة لمشتقاته مثل الإستر ، والألدهيد ، والحمض .

تقدير فيتامين (أ) فلورمتريا في اللبن :

١ ـ يصبن ١ مل من اللبن مع ٢ مل بيروجالول إيثانولي ١٪ + ٢ مل هيدروكسيد

بوتاسيوم ٣٧,٥٪ على ٦٠°م لمدة نصف ساعة .

٢ ـ برد العينة ، ثم أضف ١٠ مل هكسان ، وهز على هزاز ١٠ دقائق ، ثم أضف ماء مقطرًا لرفع مستوى طبقة الهكسان ثم اطرد مركزيًا ٥ دقائق .

٣ ـ انقل ٣ مل من المستخلص بمحقن إلى خلية الفلوروسبكتروفوتومتر ، وقدر الفلورسنت على ٤٧٥ نانومتر انبعاث Emission و ٣١٣ نانومتر تهيج Excitation .

٤ ـ أجر مقارنة بالماء المقطر ، واطرح قراءتها من قراءة العينات .

٥ ـ قدر كذلك قراءة محلول قياسي للفيتامين (خلات ريتينول في هكسان) ، واحسب تركيز الفيتامين في العينات كمكافئات ريتينول .

١٠ ـ الكاروتين والزانثوفيل :

١ ـ زن ٢ جم عينة مطحونة جافة هوائيا في دورق معياري ١٠٠ مل + ٣٠ مل مخلوط بنزين / أسيتون (٣/٧) + ٠,٥ مل ماء واتركه تحت نيتروچين ١٦ ساعة للاستخلاص في الظلام .

٢ ـ أكمل إلى العلامة بالبنزين ، ورج واتركها فترة ، ثم اسحب منها ٥ مل ، توضع على عمود كروماتوجرافى ملىء بأكسيد الماغنسيوم والسيليت (١ : ١) ، وتسحب بواسطة تفريغ من مضخة مائية لمدة ٣ دقائق .

٣ ـ ثم يغسل العمود بمقدار ٢٠–٢٥ مل مخلوط بنزين / أسيتون (١/٩) نقطة نقطة، وينتهي التطوير بالحصول على مخلوط البنزين / أسيتون (محتوية على الكاروتين) خلال العمود في دورق معياري ٢٥ مل .

٤ ـ أكمل الدورق المعياري إلى العلامة بنفس المخلوط (بنزين / أسيتون) ، وقس الكثافة الضوئية ضد مقارنة من مخلوط (بنزين / أسيتون) على ٤٥١ نانومتر .

$$\text{٥ ـ قدر الكاروتين (مجم / كجم)} = \frac{\text{الكثافة الضوئية} \times ١٩,٩٢٠٣١٥ \times ١٠٠}{\text{وزن العينة (جم)}}$$

علماً بأن المعامل ١٩,٩٢٠٣١٥ يصلح فقط للحجم النهائي ٢٥ مل .

٦ ـ اغسل العمود بمقدار ٢٠–٢٢ مل مخلوط بنزين / إيثانول (١/١) بالتنقيط ، واستقبل الغسول في دورق معياري ٢٥ مل ، وأكمله إلى العلامة بنفس المخلوط (بنزين / إيثانول) ، وقس الكثافة الضوئية على ٤٤٥ نانومتر .

$$\text{٧ ـ قدر الزانثو فيل (مجم / كجم)} = \frac{\text{الكثافة الضوئية} \times ٢١,٦٤٥ \times ١٠٠}{\text{وزن العينة (جم)}}$$

علماً بأن المعامل ٢١,٦٤٥ يصلح فقط في حالة الحجم النهائي ٢٥ مل .

تقدير الكاروتين :

١ ـ تقطع عينة طازجة ، ويوزن منها ١٠ جم فوراً ، وتوضع في كأس ٢٥٠ مل ، وتغطى بالأسيتون ، وتترك على ٤٠م لمدة ليلة في ظلام .

٢ ـ يرشح الأسيتون إلى قمع فصل ٢٥٠ مل .

٣ ـ تنقل باقي العينة من الكأس إلى خلاط ، ويضاف إليها كمية من الإيثير البترولي (٤٠–٦٠ درجة غليان) ، وضعف الكمية أسيتون ، على أن تغطى كمية المذيبات أسلحة الخلاط ، ويتأكد من وجود رغوة قبل تشغيل الخلاط ، وإلا يضاف بعض الماء ؛ لأن الرغوة تمنع الفقد من العينة . يخلط ٥ دقائق .

٤ ـ يرشح المخلوط ، وتكرر عملية الخلط والترشيح ٣–٤ مرات ، وتجمع المستخلصات على قمع الفصل الذي يكون به طبقتان ، السفلى وبها الأسيتون التي تفصل ، ويؤخذ منها ٢٥ مل ويضاف إليها كحول ميثيل ، وترج بشدة في قمع فصل .

٥ ـ تزال الطبقة السفلى ، ويستمر تكرار العملية السابقة حتى تصبح هذه الطبقة عديمة اللون .

٦ ـ تجمع كل الطبقات العليا ، وتغسل بالماء ٣ مرات ، وترشح على كبريتات صوديوم إلى كأس ١٠٠ مل ، وتقرأ كثافتها الضوئية على ٤٤٠ نانوميتر .

٧ ـ يجرى تقدير الكثافة الضوئية لمحلول قياسي (٢ جم بيكرومات بوتاسيوم في لتر ماء، يتشابه لونها مع اللون الناتج من إذابة ٣٥ مجم كاروتين / لتر ، أي ٣٥ جزءاً في المليون) .

٨ ـ احسب تركيز الكاروتين مجم / ١٠٠ جم عينة =

$$\frac{\text{التركيز جزء في المليون} \times ١٠٠ \times ١٠٠}{١٠٠٠٠٠٠ \times \text{وزن العينة}} = \frac{\text{التركيز جزء في المليون}}{\text{وزن العينة} \times ١٠٠}$$

١١ـ ڤيتامين (د) ضوئيا بثلاثي كلوريد الأنتيمون :

١ـ تصبن واستخلاص العينة : زن وزنة من زيت كبد الأسماك مع بوتاسا كاوية كحولية (١ : ١٠) ، واغل أسفل مكثف عاكس لمدة ٤٥ دقيقة ، ثم أضف ٢٠ مل ماء ، واستخلص المخلوط بالإيثير دي إيثيلي (٤٠ مل ثم ٣ مرات × ٢٠ مل) ، واجمع مستخلصات الإيثير ، واغسلها بالماء (٥٠ مل) ، واستمر في الغسيل حتى يصير الغسول متعادلاً للفينولفثالين . جفف المستخلص على كبريتات صوديوم لا مائية ، ثم جففه على حمام مائي بدون زيادة تسخين المتبقيات . انقل المتبقيات الجافة إلى دورق صغير بأقل

كمية من الإيثير البترولي . في حالة كبسولات ڤيتامين (د) ، ومخلوط الڤيتامينات تفك عدة كبسولات وتزال محتوياتها بالغسيل بالإيثير الإيثيلي الذي يبخر ، وتصبن متبقياته الزيتية كما سبق ذكره عاليه . وقد تغلى الكبسولات مباشرة في البوتاسا الكاوية الكحولية كعاليه . وفي حالة المواد الصلبة فيتم طحنها في هاون ، وتغلى نصف ساعة تحت مكثف عاكس في البوتاسا الكاوية الكحولية ، ثم تزال المواد الصلبة بالطرد المركزي ، ويعاد تسخينها ثانية مع حجم جديد من هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية ، ويعاد طردها مركزيا ، وتجمع المستخلصات السائلة ، وتستخلص في إيثير إيثيلي كما في الزيوت ، والجزء الصلب يغسل على قمع بخنر بالإيثير الإيثيلي الذي يضاف للمستخلص الإيثيري ، ويغسل المستخلص الإيثيري ويبخر للجفاف كما سبق .

٢ ـ **الفصل الكروماتوجرافي** : عمود كروماتوجرافي يسد طرفه السفلي بالقطن ، ويملأ بالسيليت Celite وأكسيد الماغنسيوم (١ : ١) ، مع السحب بواسطة التفريغ من أسفل حتى ارتفاع حوالي ٦ سم ، وتوضع عليه حوالي ١ سم ارتفاع كبريتات صوديوم لامائية . اغسل العمود بالإيثير البترولي (٥٠ مل) ثم ضع محلول العينة للجزء غير المتصبن واغسل العمود بالإيثير البترولي . وإذا لوحظ العمود تحت الأشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة تظهر ٥ مناطق من القمة للقاعدة ، هي شريط ضيق ذو فلورسنت أزرق باهت، شريط عريض فلورسنتي أصفر مخضر يحتوي الريتينول ، شريط ضيق رمادي فاتح الفلورسنت ، شريطان ضيقان حوالي ٢ م ذات فلورسنت أزرق ، شريط ضيق ذو فلورسنت أزرق رمادي . يمكن تطوير الثلاث مناطق السفلى فقط بالإيثير البترولي ، والتي تجمع في قابلة وتبخر حتى الجفاف ، وتنقل متبقياتها بالإيثير البترولي إلى دورق معياري .

٣ ـ **تقدير الكالسيفيرول** : ينقل ٠,٥ مل من المستخلص البترولي إلى أنبوبة ذات سدادة سعة ١٠ مل + ٩,٥ مل محلول ثلاثي كلوريد الأنتيمون (أذب ١٥ – ٢٢ جم ثلاثي كلوريد الأنتيمون $Sb\,Cl_3$ في ١٠٠ مل دي كلورو إيثان ، دفئ إذا كان ضروريا ، رشح وأضف ٢ مل كلوريد الأسيتيل لكل ١٠٠ مل راشحا) . رج الأنابيب بشدة ، وانقل المحلول إلى خلية سبكتروفوتومتر لقياس الكثافة الضوئية على ٥٠٠ نانومتر . أقصى قراءة يمكن الحصول عليها بعد دقيقة من إضافة الدليل إلى مستخلص العينة ، وتظل القراءة ثابتة لمدة ٥ – ١٠ دقائق .

٤ ـ يجرى عمل التقدير كذلك على محلول قياسي من ڤيتامين (د) لتعيين تركيز الڤيتامين في العينات .

تقدير ڤيتامين (د) بحمض ثلاثي فلوروخليك :

١ ـ تخلط العينة (تحتوي ٥–١٥ ميكروجرام إرجو كالسيفيرول)مع ٢ مل من محلول

هيدروكينون ٠,١ ٪ (أذب ٥٠ مجم بلورات هيدروكينون في ١ مل دي إيثيل إيثير ، وخفف إلى ٥٠ مل بالكلوروفورم . يحضر طازجاً يوميا) .

٢ ـ بخر المخلوط تحت تفريغ على ٣٥ - ٤٠°م ، وأضف إلى المتبقيات ٠,٥ مل كلوروفورم ، واخلط ثم أضف ٢ مل حمض ثلاثي فلورو خليك ، واخلط جيداً .

٣ ـ انقل المخلوط إلى خلية سبكتروفوتومتر في خلال ٥٠ ثانية ، وقدر أقصى امتصاص على ٤٩٠ نانومتر خلال ١-٣ دقائق من الخلط ، مع تصفير الجهاز باستخدام مقارنة من المذيبات (كلوروفورم / حمض ثلاثي فلورو خليك (١+٤)) .

٤ ـ بعد القياس أضف ٢ نقطة من محلول فوق أكسيد الهيدروچين (٣٠٪) في خلية الجهاز ، واخلط وقدر الامتصاص ثانية بعد دقيقتين ± ثانيتين من إضافة فوق أكسيد الهيدروچين .

٥ ـ اطرح القراءة الأخيرة من الأولى ، واحسب كمية الإرجو كالسيفيرول بالمقارنة بمحلول قياسي معامل بالمثل .

١٢ـ ڤيتامين هـ (ألفا ـ توكوفيرول في الحيوانات ، وألفا وبيتا وجاما توكوفيرولات في البذور الزيتية) :

توضع وزنة مناسبة (١جم) من الزيت في دورق ١٠٠ مل مثبت عليه مكثف عاكس ، ثم يضاف إليها ١٠ مل كحولاً مطلقاً + ٢٠ مل حمض كبريتيك كحولي عياري . لف المكثف والدورق بورق الألمونيوم لحجب الضوء ، واغل ٤٥ دقيقة . برد وأضف ٥٠ مل ماء، وانقل إلى قمع فصل (مغطى بورق الألمونيوم) باستخدام ٥٠ مل ماء آخر . استخلص المادة غير المتصبنة ٥ مرات × ٣٠ مل دي إيثيل إيثير . اغسل المستخلصات الإيثيرية ، وجفف على كبريتات صوديوم لامائية . بخر الإيثير على درجة منخفضة ، وفي معزل عن الضوء . تنقل المتبقيات من المستخلص في تيار من النيتروچين ، وأذبها في ١٠ مل كحولاً مطلقاً ، وانقلها وكذلك محلول قياسي (٠,٣ - ٣,٠ مجم ڤيتامين هـ) إلى دوارق معيارية ٢٠ مل ، وأضف إلى كل منها ٥ مل كحولا مطلقاً + ١ مل حمض نيتريك مركزاً (تضاف بالتنقيط مع التقليب) ضع الدوارق على حمام مائي (٩٠°م) لمدة ٣ دقائق بالضبط من وقت غليان الكحول . برد بسرعة تحت ماء جار ، وأكمل الحجوم إلى العلامة بالكحول . قدر الكثافة الضوئية على ٤٧٠ نانومتر ضد مقارنة (من ٥ مل كحولاً مطلقاً + ١ مل حمض نيتريك مركزاً ، وتعامل كالعينة تماماً من غليان ، واستكمال الحجم ، وقراءة الكثافة الضوئية) .

١٣ـ ڤيتامين ك ٣ K_3 (ميناديون Menadione) :

يجرى تقدير ڤيتامين ك٣ بطريقة ضوئية بحساسية تبلغ ١ مجم / كجم ، بشرط إجراء

جميع الخطوات بعيداً عن ضوء الشمس المباشر ، وباستخدام زجاجيات مصنفرة معتمة ، خالية من المنظفات ؛ لذا تغسل جميعها بحمض هيدروكلوريك (١ : ١) ، ثم بالأسيتون وتجفف .

١ ـ زن عينة بالضبط حوالي ٥ جم (مركزات فيتامين) أو ٢٠ - ٣٠ جم (مواد علف) ، وانقلها إلى دورق مخروطي ٢٥٠ مل بسدادة . أضف ٩٦ مل إيثانول (٤٠٪) ، وهز ميكانيكيا ١٥ دقيقة على حرارة الغرفة .

٢ ـ أضف ٤ مل محلول تانين (١٠ جم / ١٠٠ مل) ، واخلط وانقل إلى أنبوبة طرد مركزي للطرد المركزي ، للحصول على محلول رائق ، ينقل منه ٢٠ - ٤٠ مل في قمع فصل ٢٥٠ مل + ٥٠ مل دي كلورو إيثان ، واخلط ثم أضف ٢٠ مل محلول كربونات صوديوم لامائية (١٠٪) ، ورج بشدة ٣٠ ثانية ، ثم اجمع طبقة دي كلورو إيثان في قمع فصل آخر ١٠٠ مل .

٣ ـ أضف إليها ٢٠ مل ماء ، وهز ١٥ ثانية ، واسمح بفصل الطبقات ، ثم اجمع طبقة دي كلورو إيثان ، وبخرها حتى الجفاف تحت تفريغ في جو من النيتروجين على حمام مائي (٤٠م) .

٤ ـ بسرعة عامل المتبقيات بالداي كلور إيثان للحصول على محلول يحتوي ٢-١٠ ميكروجرام ميناديون / مل ، وانقل منها ٢ مل إلى دورق ١٠ مل ، وأضف إليها ٣ مل دليل هيدرازين (أذب ٠,٠٤ جم ٢-٤- دي نيترو فينيل هيدرازين في ٤٠ مل إيثانول مطلق يغلي . برد وانقل إلى دورق ٥٠ مل ، وأضف ٠,٤ مل حمض هيدروكلوريك مركزاً ، وأكمل إلى حجم ٥٠ مل بالكحول المطلق (إيثانول) . ويحضر طازجاً قبل الاستخدام مباشرة) ، سد وسخن ساعتين على حمام مائي (٧٠م) .

٥ ـ برد ثم أضف ٣ مل إيثانول أمونيومي (حجم إيثانول مطلق مع حجم أمونيا (١ :٣)) ، اخلط وأكمل إلى ١٠ مل بالكحول المطلق ، واخلط ثانية ثم قدر الامتصاص الضوئي للمركب الأخضر المزرق على طول موجة ٦٣٥ نانومتر ضد مقارنة من ٢ مل دي كلور إيثان + ٣ مل دليل هيدرازين ، والتسخين ساعتين على ٧٠م كما ذكر مع العينة (خطوة رقم ٤) .

٦ ـ يجرى عمل منحنى قياسي بمعاملة ٢ مل محلول قياسي (أذب ٢٠ مجم ميناديون في دي كلورو إيثان ، ويكمل إلى ٢٠٠ مل ، ويؤخذ منه أحجام مختلفة ، وتخفف بالدي كلورو إيثان ، لعمل محاليل قياسية تحتوي ٢-١٠ ميكروجرام / مل ، تحضر هذه المحاليل طازجة أولاً بأول) كما أجرى على العينة في خطوة رقم ٤ ، وتوقع العلاقة بين التركيز والامتصاص في منحنى قياسي لتقدير تركيز الفيتامين في العينة مجم / كجم .

ويمكن الرجوع إلى المراجع التالية عند الحاجة :

- De Luca , H.F.& Blunt, J . W . (1971) In : Me Cormick , D.B & Wright , L . D .(ed.) Methods in Enzymology , vol .XV111 Vitamins and Coenzymes , part C , Academic Press , N . Y .
- Dugan , R.E. et al . (1964) Anal . Chem . , 36 : 114 .
- Egan , H.et al . (1981) Pearsonas Chemical Analysis of Foods , 8th Ed . Churchill , Edinburgh & London .
- Gharbo , S.A. & Gosser, L.A. (1967) the Vitamins . 2 nd Ed , Vol . VI. Academic Press , N.Y .
- Gorgy, P. & pearson, W. N. (1974) Analyst, 99 : 222 .
- Knobloch , E.& Cerna - Heyrovska, J. (1979) Fodder Biofactors . Academia, Praha .
- Lee S.R . (1975) Food Analysis . 3rd Ed ., Leonard Hill Books , London .
- Mc Cormick , D.B. & Wright , L.D. (1971) Methods in Enzymology , Vol. xv111 Vitamins and Coenzymes Part C,Academic Press,N.y.
- Merck,E. (1974) Klinisches Labor . 12. Auflage , Merck , Darmstadt - Onder scheka , k.(1973) Supplements to Z. Tierphysiol., Tierernahrg ., u , Futtermittelkde ., Heft 3: 1 .
- Osadea , M . & De Ritter , E. (1963) Feed Stuffs , 35: 26 .
-Ranganna , S . (1979) Manual of analysis of fruit and vegetable Products , Tata Mc Graw - Hill , New Delhi .
- Rettenmaier, R. Et al, (1979) Z. Lebensm. Unters. Forsch, 168 :120.
- Senyk , G.F. et al . (1974) J. Dairy Sci., 58:558 .
- Soliman , M.K. & AbdElMoty , I. (1976) A modern approach to Veterinary clinical & laboratory diagnosis. The Scientific Book Centre, Cairo .
- Varley . H . (1978) Practical Clinical Biochemistry . 4 th Ed . Arnold - Heinemann , India .
- Wong , F. F (1978) J.Agric . Food Chem ., 26: 1444 .

الفصل السابع

المـادة غـير العضـوية

١ ـ الرماد Ash :

يجرى تثبيت البواتق البلاتينية والبورسلان جيداً ، ثم يوضع بها وزنة معلومة بالضبط ، وترمد على لهب بنزن (٥٠٠-٥٧٠°م) في المنطقة الحمراء الباهتة ، بعد التسخين على لهب هادئ أولاً قبل الترميد . وترمد لمدة ساعة ، وتبرد وتوزن ، ثم يعاد الترميد ١٥ دقيقة ، وتبرد وتوزن ، وتكرر ذلك حتى ثبات الوزن ، وإن كان الترميد بطيئاً فتضاف نقط من محلول كربونات أمونيا لنسرع من الحصول على الرماد الأبيض . وعموماً فإن البواتق البلاتينية ثمينة السعر ، كما أنها تتأثر بالرماد الغني بالمعادن؛ لذا تستعمل عادة بواتق بورسلان أو زجاج مقاوم للحرارة . ويجب تسخين العينة أولاً على موقد مفتوح قبل الترميد في الأفران Muffle Furnace على ٥٥٠-٥٧٠°م ، ولا ترتفع الحرارة عن ذلك ؛ لأن على ٦٠٠°م يفقد كَمٌ كبير من الكلوريد .

وقد يستمر الحرق على ٥٠٠°م لمدة ٥ ساعات أو على ٦٠٠°م لمدة ساعتين أو أكثر ، طبقاً لنوع العينة فقد تتطلب وقتاً أكبر للحصول على رماد أبيض . وإذا تم الحرق على لهب بنزن فنحتاج حاملاً ثلاثياً ، ومثلثاً خزفياً ، مع تقليل اللهب ما أمكن ، وتمرير البوتقة (بواسطة الماسك المعدني) كلها على اللهب ، حتى يصل اللهب أقصى قوته ، فتترك البوتقة على المثلث الخزفي ، وعند انتهاء الترميد يقلل قوة اللهب تدريجياً حتى يطفأ، وتترك ٣-٤ دقائق قبل نقلها إلى المجفف ، وذلك يتطلب ١٥-٣٠ دقيقة ، على أن يكون التسخين في منطقة اللهب العليا (١٥٠٠°م) طول المدة لأن الانتقال لداخل اللهب (١٨٠٠°م) يسبب كسر البوتقة . ويجب ألا يتعدى الفرق بين التقدير المزدوج عن ٠,٢٪ كقيمة مطلقة .

وكما هو معروف فالرماد الخام يحتوي بجانب المعادن كذلك المواد غير العضوية الأخرى كالرمل والطين ؛ لذلك يقدر ما يعرف بالرماد غير الذائب في الحامض Acid Insoluble Ash أو السليكا وذلك كالتالي :

١ ـ بعد الترميد السابق تقديره بالحرق على ٥٥٠°م لمدة ليلة ، غط الرماد في البوتقة بحوالي ٥ مل Hce أو HNO_3 مركزاً ، وبخر على حمام مائي حتى الجفاف . كرر ذلك مرة أخرى .

٢ ـ جفف على ١٥٠°م لمدة ساعة على حمام رملي .

٣ ـ أضف ٢٠ مل HCl ١٠٪ ، وسخن ١٠ دقائق على حمام مائي .

٤ ـ رشح على ورق ترشيح خالي الرماد Ashless grade ، كرر باستخدام ٢٥ مل حمضاً مخففاً مرتين.

٥ ـ اغسل كل الرماد إلى ورقة الترشيح بالماء المقطر الساخن ، واغسل ما على ورقة الترشيح كذلك .

٦ ـ ضع ورقة الترشيح بما عليها ثانية في البوتقة ، وأعد الترميد لاستنتاج المادة المتبقية وزناً ، فهي وزن الرماد غير الذائب في الحامض أو السليكا .

بينما نواتج الترشيح والغسيل تجمع في دورق معياري ، وتكمل للعلامة ، وتعرف بمستخلص الرماد Ash extract الذي يقدر فيه بعض المعادن كالحديد والكالسيوم والماغنسيوم والصوديوم والبوتاسيوم والنحاس والمنجنيز والزنك .

كما قد نحتاج إلى تقدير قلوية الرماد Alkalinity of Ash فتجرى كالتالي :

١ ـ إلى الرماد المقدر عادي يضاف ٢٠ مل HCl ٠,١ عياري .

٢ ـ يذاب بالتسخين على حمام مائي ، رشح على ورق ترشيح رقم ٥٤ .

٣ ـ اغسل البوتقة وورقة الترشيح بماء مقطر ساخن ، كرر الاستخلاص بالحامض مرتين .

٤ ـ برد الراشح ونقط بالصودا الكاوية ٠,١ عياري مع وجود دليل برتقالي الميثايل .

٥ ـ يرجع الفرق بين حجمي الحامض المضاف والصودا لقلوية الرماد .

٦ ـ احسب القلوية في صورة كربونات بوتاسيوم حيث إن كل :

١ مل ٠,١ عياري حمض هيدروكلوريك = ٠,٠٠٦٩١ جم كربونات بوتاسيوم .

ولتقدير الرماد الذائب في الماء Water Soluble Ash يضاف للرماد في البوتقة ٢٥ مل ماء مقطراً ، ويغلى ثم يرشح على ورق ترشيح خالي الرماد ، واغسله بالماء الساخن ، وأعد ترميد ورقة الترشيح بما عليها ، فيكون الرماد الذائب في الماء هو حاصل طرح الرماد الأخير (غير الذائب في الماء) من الرماد الكلي المقدر أولاً .

تقدر قلوية الرماد غير الذائب بنفس الطريقة المذكورة لتقدير قلوية الرماد . وقد يجرى الترميد جافاً Dry Ashing كما سبق ذكره عاليه أو يجرى ترميد (أو هضم) رطب Wet digestion سواء بحمض النيتريك مع الكبريتيك أو باستخدام الكبريتيك والنيتريك والبيركلوريك ، أو باستخدام الكبريتيك والنيتريك وفوق أكسيد الهيدروچين ، في إعداد المستخلص النباتي لتقدير العناصر الغذائية من أزوت وكالسيوم وفوسفور وخلافها .

ويقدر على سبيل المثال كلوريد الصوديوم في الجزء المسمى بمحلول الرماد الذائب في الماء ، فيؤخذ ٥٠ مل من راشح الرماد الذائب في الماء ، وينقط بنترات الفضة ٠,١ عياري مع وجود كرومات البوتاسيوم كدليل حتى ظهور اللون البني المحمر ، فيكون وزن كلوريد الصوديوم جم مساوياً لحجم النترات × عياريتها × ٠,٠٠٥٨٥ .

ويتم تقدير المعادن بأكثر من طريقة ، سواء بالترسيب (وزن) ، بالمعايرة (حجم) ، قياس لون اللهب ، قياس ألوان محاليلها بعد تفاعلها مع دلائل ملونة خاصة ، استخدام مطياف الإشعاع الذري ، وغيرها من طرق أحدث كالكروماتوجرافي (غازي ورقيق الطبقات) وغيرها . والمعدن الواحد يمكن تقديره بأكثر من طريقة ، كما يمكن تقدير أكثر من معدن في مستخلص واحد .

رماد اللبن :

يوضع في بوتقة قطع من ورق ترشيح عديم الرماد ، والتي تشبع بحوالي ١٠ جم لبناً ، ثم تجفف البوتقة باللبن في فرن على ٦٠°م حتى تمام الجفاف ، ثم تحرق حتى تبيض محتويات البوتقة .

رماد البيض :

يقدر في القشرة بالترميد الجاف العادي بينما يقدر في مكونات البيض الداخلية بالترميد الرطب Wet Ashing أي بالهضم الرطب Wet Oxidation بوضع ١٠ جم عينة في دورق كلداهل ثم يضاف ٢٠ مل حامض نيتريك مركزاً مع ٢٠ مل ماء واغل ١٠ دقائق حتى يصل الحجم إلى ٢٠ مل ، برّد وأضف ١٠ مل حامض كبريتيك مركزاً ، واغل ثانية ثم أضف كمية بسيطة من حامض النيتريك بسرعة (وإلا قد يحدث فقد في العناصر) إن استمر المحلول مسوداً ، واستمر في التسخين حتى يروق المحلول ويبيض فبرّد ثم أضف ١٠ مل من محلول أوكسالات أمونيوم مشبع واغل مرة أخرى حتى يروق المحلول ويبيض ثانية ؛ إذ يساعد محلول الأوكسالات على إزالة التلون الأصفر الراجع لمركبات النيترو والدهون وخلافها فيظهر المحلول النهائي عديم اللون .

٢ ـ الصوديوم Sodium (Na) :

١ ـ ترطب وزنة من العينة بحامض كبريتيك (١ عينة + ١٠ حامض) في بوتقة ، ثم تجفف ، ثم تحرق على ٥٠٠°م .

٢ ـ يضاف للرماد ٢-٥ مل حامض هيدروكلوريك مركزاً وتسخن ، ثم يضاف ٤٠ مل ماء مقطراً ، وتسخن للغليان ، ثم يضاف وفرة من محلول كلوريد كالسيوم (٥ ٪) لترسيب الفوسفات .

٣ ـ يكمل ترسيب الفوسفات بإضافة هيدروكسيد الأمونيوم ، ثم يرشح ويغسل

الراسب، ويستقبل الراشح في آنية نظيفة .

٤ ـ يبخر الراشح لتركيزه إلى ٥ مل أو أقل ، ثم يبرد ويضاف ١٠٠ مل محلول خلات يورانيل المغنسيوم (خلات يورانيل ٨٥ جم + ٦٠ جم حامض خليك في كأس سعة لتر ، ويضاف ماء إلى حجم ٩٠٠ مل ، ويسخن للذوبان ، ثم يبرد ويكمل بالماء المقطر إلى لتر . في كأس آخر سعة لتر يذاب ٥٠٠ جم خلات مغنسيوم + ٦٠ جم حامض خليك في ٩٠٠ مل ماء مقطراً بالتسخين ، ويبرد ويكمل بالماء إلى لتر . يسخن المحلولان السابقان كل على حدة على ٧٠ْم ، ثم يمزجان عند هذه الدرجة ، ويبردان إلى ٣٠ْم ، ثم في حمام مائي على ٢٠ْم لمدة ساعتين ، ويرشح في إناء جاف) .

٥ ـ يغمر الكأس (إلى مستوى سطح المحلول به) في حمام مائي على ٢٠ْم مع التقليب بشدة ، وإلا فيترك ٢٤ ساعة على ٢٠ْم ، ثم يرشح على بوتقة جوتش مثبتة الوزن المعلوم ، مع الغسيل بمحلول خلال يورانيل المغنسيوم .

٦ ـ يجفف الراسب لمدة ٣٠ دقيقة على ١٠٥ْم ، ثم تبرد البوتقة وتوزن ، فالزيادة في وزنها عبارة عن وزن خلات يورانيل المغنسيوم والصوديوم الذي بضربه × ٠,٠١٥٣ نحصل على وزن الصوديوم .

هذا ويقدر الصوديوم بسهولة ويسر وبسرعة بقياسه مباشرة في مستخلص الرماد على مضواء اللهب Flamephotometer مع عمل منحنى قياسي لمحاليل صوديوم قياسية .

٣ ـ البوتاسيوم Potassium (K) :

١ ـ توزن عينة في بوتقة ، وتغمر بعشرة أضعافها وزناً من حامض الكبريتيك المركز ، ثم تجفف ، ثم تحرق على ٥٠٠ْم .

٢ ـ يضاف ٢–٥ مل حامض هيدروكلوريك مركزاً ، ويسخن ثم ينقل كميا إلى كأس، ويضاف هيدروكسيد أمونيوم بالتنقيط حتى يصبح الراسب المتكون غير قابل للاختفاء بالتقليب الشديد .

٣ ـ يسخن إلى الغليان ، ثم يعاد إضافة هيدروكسيد الأمونيوم (لترسيب الحديد والألومنيوم وغيرها) ، ثم يغطي بزجاجة ساعة ويغلي لمدة ١ دقيقة ، وإذا لم تكن رائحة الأمونيا ظاهرة فتضاف نقطة نقطة حتى تظهر رائحتها في الكأس .

٤ ـ يقلب ويرشح ، ويغسل بالماء المقطر الساخن مع الاحتفاظ بالراشح كميا .

٥ ـ ينقل الراسب إلى نفس الكأس ، ويذاب في قليل من حامض الهيدروكلوريك ويدفأ ، ويعاد إضافة الماء ثم الأمونيا للتأكد من ترسيب الحديد والألومنيوم والفوسفور ، ثم يرشح ، ويغسل حتى يتم التخلص من الكلور ، مع الاحتفاظ بالراشح .

٦ ـ يجمع الراشحان من خطوتي ٤ ، ٥ ويجففان معاً للغليان ، ثم يسخن لأقل من

٤٥٠ْم في فرن حريق لتفكيك أملاح الأمونيوم ، ويذاب المتبقي في ماء دافئ بعد أن تبرد البوتقة .

٧ ـ يضاف ٥ مل هيدروكسيد باريوم مشبعاً ويسخن للغليان ، ثم يترك المحلول ليروق ويرشح ، ويغسل بوفرة من الماء المقطر ويحتفظ بالراشح .

٨ ـ يغلي الراشح ، ويضاف أربعة أمثاله أمونيا وقليل من محلول كربونات أمونيوم (١٠ ٪) لتمام ترسيب الباريوم والكالسيوم وغيرها .

٩ ـ يسخن لمدة ٥ دقائق ، ثم يرشح ويغسل بوفرة من الماء المقطر مع الاحتفاظ بالراشح الذي يجفف ثم يسخن على أقل من ٤٥٠ْم .

١٠ـ يضاف قليل من الماء وقطرات هيدروكسيد أمونيوم ونقطتان من كربونات الأمونيوم وقطرات من محلول أكسالات أمونيوم مشبعة ويسخن .

١١ـ يترك المحلول عدة ساعات ثم يرشح ويغسل بالماء المقطر ، ويجفف الراشح بالغليان، ثم يسخن المتخلف من التجفيف إلى أقل من ٤٥٠ْم .

١٢ـ يذاب في قليل من الماء المقطر ، وينقل كميا إلي بوتقة، ويضاف نقط من حامض هيدروكلوريك مركزا ، ويجفف ثم يسخن لأقل من ٥٠٠م ، ويبرد في مجفف .

١٣ـ يضاف ٣-٥ مل حامض بيركلوريك ٦٠ ٪ ، ويجفف ثم يذاب في ماء مقطر ، ثم يجفف ثانياً ثم يسخن لحوالي ٣٥٠ْم ويبرد .

١٤ـ يضاف ١٠-٢٠ مل مخلوطاً لامائياً من خلات الإيثيل والبيوتانول (١ : ١) ، ويسخن لقرب الغليان ، ثم يبرد ويعاد التسخين لقرب الغليان عدة مرات .

١٥ـ ينقل إلى بوتقة جوتش مثبتة الوزن المعلوم بواسطة مخلوط خلات الإيثيل والبيوتانول ويغسل به عدة مرات .

١٦ـ يذاب في قليل من الماء المقطر ، ويجفف وتعاد الخطوتان ١٤ ، ١٥ ، ثم يجفف على ١١٠ْم ، ثم يسخن على ٣٥٠ْم لمدة ١٥ دقيقة ثم يبرد .

١٧ـ يوزن والفرق بين وزن البوتقة بالرواسب ووزنها فارغاً هو وزن بيركلورات البوتاسيوم التي بضربها × ٠,٢٨٢٢ نحصل على وزن البوتاسيوم .

وإذا توفر مضواء اللهب يكون أسهل وأسرع في تقدير البوتاسيوم بقراءة التركيز في مستخلص الرماد ومضاهاته بمنحنى قياسي لمحاليل قياسية للبوتاسيوم .

ومن الطرق الحجمية الأخرى لتقدير البوتاسيوم ما تعتمد على ترسيب البوتاسيوم من مستخلص الرماد الحامضي كملح نيتريت كوبلت أصفر ، يذاب في حمض مخفف ساخن ، ويعاير بمحلول قياسي من برمنجنات بوتاسيوم ، حيث كل ١ مل برمنجنات

بوتاسيوم ٠,٠١ عياري ≡٠,٠٧ مجم بوتاسيوم .

٤ ـ الكلوريدات (Cl) Chlorides :

١ ـ منعاً من فقد جزء من الكلوريدات أثناء الترميد فينبغي الترميد بطريقة خاصة . فتوزن ٢جم عينة في بوتقة ، وترطب بقليل من محلول كربونات الصوديوم النقية (٥٪) ، ثم تضاف كمية مماثلة من هيدروكسيد الصوديوم (٥٪) ، تجفف البوتقة جيداً في فرن تجفيف .

٢ ـ ترطب ثانية بقليل من الماء ، ثم تجفف ثانية ثم تحرق لعمل الرماد .

٣ ـ يذاب الرماد في حامض نيتريك مخفف (١ : ٣) ، ويرشح على دورق مخروطي .

٤ ـ ترسب الكلوريدات بحجم معلوم من نترات الفضة (٠,٠٢ عياري) ويزيد عن اللازم للترسيب . ويغلي المحلول حتى يتجمع الراسب في الدورق المخروطي .

٥ ـ يبرد الدورق ، وترشح محتوياته ، ويضاف إلى الراشح ٥ مل محلول دليل الحديديك (شب الحديد) ، ثم ترسب النترات الزائدة بواسطة ثيوسيانات البوتاسيوم أو الأمونيوم (٠,٠٢ عياري)حتى يبدأ اللون البني في الظهور .

٦ ـ يحسب حجم الثيوسيانات العيارية التي عادلت الزيادة من النترات بضرب حجمها × قوتها = مل عياري .

٧ ـ ويحسب حجم نترات الفضة المضافة العيارية ، بضرب حجمها × عياريتها = مل عياري.

٨ ـ وعليه فيكون حجم نترات الفضة التي تكافئ كلوريدات الرماد (مل عياري) هو حاصل طرح الخطوتين (٧-٦) .

٩ ـ وحيث إن ١ مل عياري من نترات الفضة ≡٠,٠٣٥ جم كلوريد ، فيمكن حساب وزن الكلوريد وحساب نسبته في العينة وقد يعبر عنه ككلوريد صوديوم .

ويبلغ مستوى كلوريد البلازما ٦٩- ١٠٦ ملي مكافئ / لتر ، ويتأثركلوريد البول بكمية الملح المأكولة في العليقة . ويبلغ صوديوم البلازما ١٣٣-١٤٦ ملي مكافئ / لتر . وقد يفقد الصوديوم والكلوريد من القناة الهضمية بالقيء والإسهال ، وفي البول والعرق مؤدية إلى انخفاض كلوريد البلازما . والقيء قد يصاحب كثيراً من الحالات ، مثل غيبوبة السكر وغيبوبة البولينا وتسمم الحمل ، والتي يصاحبها انخفاض قيم كلوريد وصوديوم البلازما . كما أن الفقد في البول يصاحب تعدد مرات التبول في حالات مرض السكر والتهاب الكلى المزمنين .

وقد يرتفع كلوريد وصوديوم البلازما في بعض حالات التهاب الكلى الحاد وانسدادات

القناة البولية وورم البروستاتا .

الملح Salt (Na Cl) :

١ ـ زن ٥ جم عينة ، واخلطها مع جير ، ثم رمد بالحريق .

٢ ـ اغسل الرماد على ورق ترشيح بالماء المقطر الساخن ، واجمع الراشح .

٣ ـ أضف إلى الراشح ٣ نقط من دليل فينولفثالين ، ثم نقط بحمض كبريتيك ٠,٠٥ عياري حتى انعدام اللون (يستخدم أولاً حمض عياري ، وعند قرب نقطة زوال اللون حمض ٠,٠٥ عياري) .

٤ ـ أضف ٣ نقط من كرومات البوتاسيوم ، ونقط بنترات الفضة ٠,١ عياري حتى يظهر ظل أحمر باهت .

٥ ـ النسبة المئوية لكلوريد الصوديوم =

حجم نترات الفضة المستخدمة في التنقيط × ٠,٠٠٥٨٥ × $\frac{١٠٠}{\text{وزن العينة}}$.

كما يقدر الكلوريد في اللبن سواء في الرماد أو بالتنقيط المباشر . وفي الطريقة الأخيرة يسحب ١٠ مل لبناً إلى دورق ٢٥٠ مل + ١٠ مل نيترات فضة (٠,٠٥ عياري) + ١٠ مل حمض نيتريك مركزاً مع قطع من حجر خفاف ، واغل دقائق قلائل حتى يصير لون المحلول أصفر باهتاً . برد وأضف ٦٠ مل ماء + ١ مل دليل (٥٠ جم كبريتات حديديك أمونيوم في ١٠٠ مل ماء + ١ مل حمض نيتريك مركزاً) ، ونقط الزيادة من نيترات الفضة بثيوسيانات البوتاسيوم (٠,٠٥ عياري) . أجر مقارنة مماثلة على ١٠ مل ماء بدلاً من اللبن ، واستنتج تركيز الكلوريد حيث إن ١ مل ٠,٠٥ عياري ثيوسيانات بوتاسيوم ≡ ٠,٠٠١٧٧٣ جم كلوريد . وقد يقدر الكلوريد باستخدام الكترود خاص .

٥ ـ الكالسيوم Calcium (Ca) :

١ ـ يؤخذ مستخلص الرماد ، وتعادل حموضته بقطرات من الأمونيا المركزة ، وبعد التعادل يضاف ٥ نقط من حامض هيدروكلوريك ٢٥ ٪ ، ثم تضاف كمية زائدة من محلول أكسالات أمونيوم مشبعة (٢٥ مل) دافئة ببطء مع التقليب ، فيتكون راسب أكسالات الكالسيوم لونه أبيض .

٢ ـ يترك المحلول والراسب لمدة ١٢ ساعة لتجميع حبيبات الراسب ، ثم يرشح الرائق ، ويكمل نقل الراسب كمياً ، ويغسل الراسب على ورقة الترشيح بمحلول أمونيا ساخن (٢,٥ ٪) ، ويستمر في الغسيل عدة مرات للتخلص من الكلور .

٣ ـ ينقل الراسب إلى كأس الترسيب بثقب ورقة الترشيح ، ويغسل الراسب بحوالي ٢٥–٣٠ مل حامض كبريتيك ساخناً (١٢,٥ ٪) ، وينقل الراسب كميا من على ورقة

الترشيح المثقوبة إلى الكأس بكميات متتالية صغيرة من ماء مقطر ساخن .

٤ ـ تسخن محتويات الكأس للغليان ، ثم ينقط وهو ساخن ببرمنجنات بوتاسيوم (٠,١ عياري) باستعمال السحاحة .

٥ ـ كل ١ مل عياري من برمنجنات البوتاسيوم ≡ ٠,٠٢٠٠٤ جم كالسيوم .

يلاحظ بالنسبة للعينات التي لا تحتوي مادة عضوية يمكن إذابتها مباشرة في الحمض والتقدير للكالسيوم ، إلا في الأملاح التي لا تذوب في الحمض كفوسفات ألمونيوم كالسيوم فيمكن صهرها مع كربونات بوتاسيوم وكربونات صوديوم (١:١) بمعدل ٥ أوزانها من هذا المخلوط من الكربونات ، ثم تركها تبرد ثم إذابتها في حمض هيدروكلوريك، وسخن للغليان ، ثم رشح واغسل بحمض مخفف لعمل مستخلص للتقدير (دون ترميد) .

ويقدر الكالسيوم أسرع وأبسط في مستخلص الرماد، إما على مضواء اللهب أو على مطياف الامتصاص الذري Atomic Absorption Spectrophotometer على طول موجة ٤٢٢,٧ نانومتر أساسي (٥٣٥,٥ نانومتر ثانوي) ولهب هواء أسيتيلين أوكسي هيدروچين ضد محلول قياسي من كربونات كالسيوم في حمض هيدروكلوريك (١ ٪) .

تقدير الكالسيوم في مستخلص النبات :

كما يقدر الكالسيوم ضوئيا في مستخلص الرماد بأخذ ٥مل من مستخلص الرماد (ومن محلول قياسي ومن ماء كمقارنة) + ٥ مل من محلول مورجان Morgan's Reagent (٣٠ مل حمض خليك + ١٠٠ جم خلات صوديوم في ماء حتى لتر) + ٢ مل محلول جلسرين ٥٠٪ مع الرج ، ثم أضف ٥ مل محلولاً مشبعاً أكسالات أمونيوم ، ثم رج بشدة لمدة دقيقة ، وانتظر دقيقة فيتكون معلق أبيض تتناسب كثافته الضوئية مع درجة تركيز الكالسيوم . قدر كثافة المعلق الضوئية باستخدام المرشح الأخضر (٥٠٠-٥٦٠ نانومتر) اطرح رقم كثافة المقارنة من رقم كثافة العينة أو المحلول القياسي واستنتج تركيز الكالسيوم في العينة .

تقدير الجير الحر :

من المهم فحص نوع الجير المطفأ سواء في دباغة الجلود أو في تجيير أحواض السمك ، إذ إن أهم عنصر في الجير المطفأ هو الجير الحر الذي يقدر بأخذ ١ جم منه في دورق معياري ، ويذاب في الماء على درجة الغليان ، ويكمل إلى العلامة ، ويبرد ويسد ، ويرج جيداً ويترك ليلة . ثم يؤخذ منه ٥٠ مل في كأس ويضاف إليه دليل فينولفثالين وينقط بمحلول حمض كبريتيك ٠,١ عياري حتى زوال اللون الأحمر ، ويتم ذلك عند تعادل

الجير الحر القلوي بالحمض . فيقدر الجير الحر كنسبة مئوية =

حجم الحمض × ٠,٠٢٨ × ١٠٠ × ٢٠ = حجم الحمض × ٠,٥٦

حيث إن كل ١ مل حمض كبريتيك ٠,١ عياري ≡ ٠,٠٢٨ جم أكسيد كالسيوم (جير حر) .

ولتقدير الكالسيوم في البيض يؤخذ ١٠ مل من الدورق المعياري لمستخلص الرماد وتوضع في جفنة نظيفة وتخفف بحوالي ٢٠ مل من الماء المقطر ثم أضف ١,٥ مل محلول صودا كاوية ٤ عيارى + ٠,١ جم مخلوط دليل كالسيوم (٠,٥ جم مسحوق أمونيوم بيربيوريت + ١٠٠ جم كبريتات بوتاسيوم) وتقلب بمحرك زجاجي وينقط بمحلول الفرسين [٢ جم فرسين + ٠,٠٥ جم كلورور مغنسيوم توضع في دورق معياري سعة ١ لتر ويكمل للعلامة بالماء المقطر ، وتقدر عياريته بمحلول كلورور كالسيوم ٠,٠١ عيارى (٠,٥ جم كربونات كالسيوم في ١٠ مل حامض هيدروكلوريك ٣عيارى (١ : ٣) ويكمل إلى لتر بالماء المقطر)] في وسط قلوي (PH=10) حتى يصير اللون قرمزيا أميل إلى البنفسجي .

تحسب كمية الكالسيوم :

كمية الكالسيوم بالعينة = حجم الفرسين × عياريته × $\frac{٢٥٠}{١٠}$ × $\frac{٢٥٠}{٢٠}$ × $\frac{١٠٠٠}{١}$ × $\frac{٢٠}{١٠٠٠}$

= حجم الفرسين × عياريته × ٦٢٥ .

كالسيوم الدم : -

انقل إلى أنبوبة طرد مركزي سعة ١٥ مل ٢ مل سيرم + ٢ مل ماء + ١ مل محلول أكسالات أمونيوم تركيز ٤٪ ، واخلط واترك الأنبوبة تستقر لمدة ٣٠ دقيقة ، ثم ترج ثانية وتطرد مركزيا ٥ دقائق على ١٥٠٠ لفة / دقيقة . يستبعد الرائق ، وتقلب الأنابيب في حامل خشبي ، على أن تركز الفوهة على ورقة ترشيح لتمام التصفية لمدة ٥ دقائق ثم تجفف الفوهة . اغسل جوانب الأنبوبة بمقدار ٣ مل أمونيا مخففة (٢ مل أمونيا مركزة + ٩٨ مل ماء مقطراً) . اطرد مركزيا مرة أخرى وصف الراشح كما سبق . يضاف ٢ مل حمض كبريتيك عياري (٢٨ مل حمضاً مركزاً تكمل إلى لتر) على الراسب لتسهيل عملية ذوبانه . ضع الأنابيب في حمام ماء يغلي لمدة دقيقة ، ثم نقط المحلول ببرمنجنات بوتاسيوم ٠,٠١ عياري (٠,٤ جم برمنجنات في لتر ماء واحفظ في ظلام) حتى يظهر اللون القرمزي الثابت ويستمر لمدة دقيقة ، مع تسخين الأنابيب باستمرار لتكون درجة حرارتها ٧٠-٧٥°م . كل ١ مل برمنجنات بوتاسيوم ٠,٠١ عياري ≡ ٠,٢ مجم كالسيوم .

وتنخفض قيم كالسيوم السيرم في حالة نقص نشاط غدد جارات الدرقية ، أو إزالة كثير من نسيجها ، وفي حالات نقص التغذية والامتصاص والإسهال ، ولين العظام ومرض الكزاز

Telany ، وفي الفشل الكلوي المصحوب بارتفاع الفوسفور غير العضوي في السيرم ، وفي التهاب البنكرياس الحاد .

بينما ارتفاع كالسيوم السيرم يلاحظ في حالات زيادة نشاط الغدد جارات الدرقية ، والذي قد يكون منشؤه خراج جارات الدرقية ، وقد تصاحب زيادة كالسيوم الدم أمراض العظام . ويؤدي الحقن بهرمون جارات الدرقية إلى زيادة كالسيوم الدم . ويؤدي زيادة نشاط غدد جارات الدرقية إلى زيادة سحب الكالسيوم من العظام ، وزيادة إخراج الكالسيوم في البول مع بقاء مستوى كالسيوم الدم في الحدود الطبيعية في كثير من الحالات . ويزيد كالسيوم الدم بزيادة تناول ڤيتامين D واللبن والقلويات ، وفي حالات سرطان العظام .

كالسيوم البول :

يؤخذ ١٠٠ مل بولاً محمضاً في دورق ، وتتم معادلتهم بالأمونيا ، ثم تضاف ٥ نقط من حمض هيدروكلوريك مركزا + ٥ مل من محلول ٢,٥ ٪ حمض أكساليك + ٤ مل من محلول ٢٠ ٪ خلات صوديوم ، ويتم الرج ثم يترك ليلة للترسيب [يمكن إجراء الترسيب بسرعة بواسطة الطرد المركزي بدلاً من تركه ليلة] ، ثم يرشح ويغسل الراسب بماء مقطر ، ثم أذب الراسب في حمض كبريتيك ٢ عياري ، ونقط ببرمنجنات بوتاسيوم ٠,١ عياري . احسب تركيز الكالسيوم في البول حيث إن كل ١ مل برمنجنات بوتاسيوم١ ,٠ عياري ≡٢ مجم كالسيوم ≡٢,٨ مجم أكسيد كالسيوم .

.. مجم كالسيوم / ١٠٠ مل بول = حجم البرمنجنات × ٢

ككالسيوم البول والسيرم :

إحدى الطرق الضوئية لقياس الكالسيوم في المحاليل البيولوچية دون ترسيب للبروتين مباشرة في السيرم أو البلازما أو البول (المخفف ١ :٣ بالماء مع ضبط PH إلى ٣-٤ بحمض هيدروكلوريك ١ ,٠ عياري) هي باستخدام دليل أزرق ميثيل ثيمول ، بينما يتخلص من تداخل الماغنسيوم بفصله بالهيدروكينولين كالتالي :

١ ـ يؤخذ ٥٠ ميكرو ليتر عينة + ٢,٥ مل دليلا ملوناً (ميثيل ثيمول أزرق ٨٠ مجم/ لتر + ٨- هيدروكينولين ١,٦ جم / لتر) + ٢,٥ مل دليلا قلويا (مثلاً ٢- أمينو-٢- ميثيل بروبانول PH أعلى من ١١) ، واخلط وقدر الكثافة الضوئية بعد دقيقة على ٦١٢ نانومتر .

٢ ـ يجرى عمل محلول قياسي ١٠ مجم / ١٠٠ مل (٢,٥ ملي مول / لتر) ، ثم خذ منه ٥٠ ميكروليتر ويجرى عليه نفس الخطوات كما في العينة .

٣ ـ قدر تجربة خاوية من ٢,٥ مل دليلاً ملوناً + ٢,٥ مل دليلاً قلويا .

٤ ـ احسب تركيز الكالسيوم = $\frac{\text{قراءة العينة}}{\text{قراءة المحلول القياسي}}$ × س .

حيث س = تركيز المحلول القياسي ملي مول / لتر (مجم / ١٠٠ مل) .

ولاحظ أن كثافة اللون ثابتة لمدة ساعة .

والقيم المتوقع الحصول عليها في السيرم ٢,٢ – ٢,٥٥ ملي مول / لتر .

٨,٨ – ١٠,٢ مجم / ١٠٠ مل .

٨٨ – ١٠٢ مجم / لتر .

وقد يمكن استخدام دليل ملون آخر من أورثو – كريزول فثالين كومبلكون (٠,١٦ ملي مول / لتر) ، مع ٨ – هيدروكسي كينولين (٦,٨٩ ملى مول / لتر) فى حمض هيدروكلوريك (٠,٠٦ مول/لتر) ويجرى نفس الخطوات مع العينة والمحلول القياسي والمقارنة ، مع أخذ ١مل فقط من كل من الدليل القلوي (PH ١٠,٧) والدليل الملون ، وقراءة الكثافة الضوئية في هذه الحالة بعد ٥–١٠ دقائق على ٥٧٠ نانومتر ، وطريقة الحساب كما هي .

٦ ـ الماغنسيوم Magnesium (Mg) :

١ ـ يؤخذ مستخلص الرماد (أو الراشح المتخلف بعد ترسيب الحديد أو الكالسيوم) ، وتضاف كمية من الأمونيا المركزة حتى يصبح المحلول قلويا .

٢ ـ يضاف تدريجيا وببطء كمية زائدة من محلول فوسفات صوديوم ثنائية القاعدة (١٢٪) ، مع التحريك المستمر .

٣ ـ يترك الراسب ليستقر ١٢ ساعة ، ثم يرشح خلال ورق ترشيح خالي الرماد ، ويغسل الراسب بمحلول الأمونيا المخففة (٢٪) حتى يخلو الراشح من الكلور .

٤ ـ ينقل الراسب وورقة الترشيح إلى بوتقة ، تحرق على ٦٠٠°م لمدة ساعتين . المتبقي هو بيروفوسفات ماغنسيوم .

٥ ـ كل ٢٢٢,٦ جم بيرو فوسفات ماغنسيوم تحتوي على ٤٨,٦٤ جم ماغنسيوم .

كما قد يقدر الماغنسيوم في مستخلص الرماد مباشرة على مطياف الامتصاص الذري على طول موجة ٢٨٥,٢ نانومتر ، مع عمل منحنى قياسي كذلك لمحاليل قياسية من الماغنسيوم .

وقد يقدر الماغنسيوم ضوئيا في مستخلص النبات في المحلول القلوي الناتج بعد إزالة الكالسيوم والحديد ، بترسيب الماغنسيوم كفوسفات أمونيوم ماغنسيوم تذاب في حمض وتقدر مباشرة كالتالي :

١ ـ خذ ١٠ مل مستخلص رماد في أنبوبة طرد مركزي + نقطة دليل أحمر ميثيل

(٠,٥ ٪ في كحول إيثيل ٩٥ ٪) ، وعادل بهيدروكسيد أمونيوم (١٠ ٪ حجم / حجم). أضف ١ مل أكسالات أمونيوم مشبعة ، وأكمل الحجم بالماء إلى ١٣ مل . اخلط واتركه ليلة يستقر ، ثم اطرد مركزيا ١٠ دقائق .

٢ ـ خذ ١ مل من الرائق إلى أنبوبة طرد مركزي + ٣ مل ماء + ١ مل فوسفات أمونيوم (٢ ٪) + ٢ مل هيدروكسيد أمونيوم (١٠ ٪) . اخلط واتركه ليلة ، ثم اطرد مركزيا ٧ دقائق وأهمل الرائق ، ثم اخلط مع ٥ مل أمونيا مخففة واطرد مركزيا ٧ دقائق واهمل الرائق . جفف الراسب بوضع الأنبوبة في إناء ماء ساخن .

٣ ـ أضف ١ مل حمض هيدروكلوريك ٠,١ مولر + ٥ مل ماء لإذابة الراسب ، ثم أضف ١ مل محلول حمض موليبديك (أذب ٢٥ جم موليبدات أمونيوم في ٣٠٠ مل ماء، خفف ٣٧ مل حمض كبريتيك إلى ٢٠٠ مل بالماء وأضفها إلى محلول موليبدات الأمونيوم، احفظ في إناء بني) + ٠,٥ مل هيدروكينون (٢ ٪ مع نقطة حمض كبريتيك/ ١٠٠ مل، اهمله إذا تحول لونه إلى البني) + ٠,٥ مل محلول كبريتيت صوديوم (١٠ ٪، يحضر أسبوعيا) ، واخلط واتركه نصف ساعة ، ثم قدر الكثافة الضوئية بمرشح أحمر (٦٠٥ – ٧٥٠ نانومتر) ضد ماء ، مع قياس الكثافة الضوئية لمحلول قياسي معلوم التركيز (٠,٤٣٨٩ فوسفات بوتاسيوم أحادية القاعدة في لتر ماء فيكون كل ١ مل ≡ ٠,١ مجم فوسفور ≡ ٠,٠٧٨٤ مجم ماغنسيوم) .

تقدير ماغنسيوم السيرم والبول (بالهيدروكينولين) :

المحاليل :

١ ـ كحول إيثايل مطلق .

٢ ـ محلول منظم خلات ٢ عياري PH ٣,٥ : أضف ١١,١ مل حمض خليك ثلجي إلى حوالي ٧٠ مل ماء ، واضبط PH على ٣,٥ بالصودا الكاوية ٢ عياري ، وخفف إلى ١٠٠ مل بالماء .

٣ ـ محلول منظم خلات ٢ عياري PH ٦,٥ : أذب ٢٧,٢ جم خلات صوديوم (ثلاثي الماء)في حوالي ٧٠ مل ماء واضبط PH على ٦,٥ بحمض الخليك وأكمل إلى ١٠٠مل.

٤ ـ هيدروكينولين : أذب ٥ جم من ٨– هيدروكينولين في ١٠٠ مل كحول إيثايل في زجاجة بنية ، واحفظها في ثلاجة ، تظل صالحة لمدة شهر .

٥ ـ محلول قياسي ٢ مجم / ١٠٠ مل : أذب ١,٧٦٤ جم بلورات خلات ماغنسيوم ، أو ٢,٠٥٤ حجم كبريتات ماغنسيوم (سباعي الماء) في ماء وأكمل إلى لتر ، ثم خفف ١ مل إلى ١٠ مل .

اخلط ٢ حجم محلول منظم PH ٣,٥ مع ٢ حجم محلول هيدروكينولين + ٨٠ حجم

كحول إيثايل + ٥ حجوم ماء . كرر ذلك مع المحلول المنظم الآخر . ضع ٣,٩ مل من المخلوط الأول في أنابيب المقارنة ، و ٣,٩ مل من المخلوط الثاني (المحتوى محلول منظم PH ٦,٥) في أنابيب العينات . أضف إلى كل الأنابيب ٠,١ مل سيرم (أو حجماً مماثلاً من بول مخفف ١ : ١٠) ، ورج دقيقتين ثم اطرد مركزيا . اسحب الرائق لقراءة فلورسنته بتنشيط على ٤٢٠ نانومتر وفلورسنس على ٥٢٠ نانومتر. أجر ما سبق على المحلول القياسي.

احسب تركيز الماغنسيوم مجم / ١٠٠ مل = $\frac{\text{قراءة العينة} \times 2}{\text{قراءة المحلول القياسي}}$ وفي البول يعمل حساب التخفيف ويحسب التركيز مجم / لتر .

ويزيد تركيز ماغنسيوم السيرم في أمراض الكلى المزمنة والحادة ، خاصة مع ندرة البول، كما تزيد في أمراض الكبد وغيبوبة السكر، بينما يقل ماغنسيوم السيرم بالحقن بالأنسولين، وفي سوء الامتصاص والقيء والإسهال ، وعند إزالة خراج جارات الدرقية ، وكذلك أحياناً في حالات التهاب البنكرياس الحاد .

ماغنسيوم السيرم أو البول (باستخدام الكالماجيت) :

يجرى تقدير ضوئى لماغنسيوم السيرم ، أو البلازما ، أو البول بدون ترسيب للبروتين وذلك باستخدام الكالما جيت كدليل ملون ، مع إزالة تداخل الكالسيوم باستخدام EGTA ، وذلك بأخذ ٥٠ ميكروليتر عينة (سيرم أو بلازما أو مخفف البول ١ : ١٠) ، أو ماء (مقارنة) أو محلول قياسي (كبريتات ماغنسيوم ١,٠٣ ملي مول / لتر أي ٢,٥ مجم / ١٠٠ مل) + ٢,٥ مل مخلوط دليل ملون (كالما جيت ١٦٠ مجم / لتر) مع دليل قلوي (EGTA ٧٠ مجم / لتر PH أعلى من ١١) ، واخلط وانتظر دقيقة ، ثم قدر الكثافة الضوئية (التي تستمر ثابتة لمدة ساعة) على ٥٢٠ نانومتر ، واحسب تركيز الماغنسيوم = $\frac{\text{قراءة العينة} \times \text{س}}{\text{قراءة المحلول القياسي}}$ حيث س = تركيز المحلول القياسي ملي مول / لتر أو مجم / ١٠٠مل.

والقيم المتوقعة للسيرم ٠,٦٥ – ١,٠٥ ملي مول / لتر

١,٦ – ٢,٥٥ مجم / ١٠٠ مل

١٦ – ٢٥,٥ مجم / لتر

هذا ويمكن تقدير الماغنسيوم في مستخلص الرماد الحمضي ، باستخدام مطياف الامتصاص الذري ، وغالباً يقدر معة المحتوى من الكالسيوم بنفس التكنيك .

٧ ـ الفوسفور Phosphorus (P) :

١ ـ يؤخذ مستخلص الرماد (الذي سبق تحضيره من الرماد ، أو بهضم رطب للعينة مع حامض الكبريتيك المركز وحامض النيتريك المركز حتى تمام أكسدة المادة العضوية ،

وروقان المحلول وتوقف تصاعد أكاسيد الأزوت الحمراء) ، ويحمض بحامض نيتريك مركز (١٠مل) ، ثم تضاف بللورات نترات أمونيوم باستمرار مع التقليب حتى تصبح العكارة الناتجة عن الإضافة بطيئة الزوال بالتقليب .

٢ ـ سخن لمدة ١ دقيقة على لهب هادئ ، ثم أضف ٢٥ مل محلول موليبدات أمونيوم (٢,٥ ٪) ببطء مع التقليب ، ثم يترك الكأس بدون تقليب لمدة ٠,٥ ساعة .

٣ ـ رشح واغسل الراسب بالماء باستمرار عدة مرات ، ثم انقل الراسب بورقة الترشيح إلى كأس الترسيب مع ٢٠ مل (أو أكثر) من محلول صودا كاوية (٠,١ عياري) لذوبان راسب فوسفور موليبدات الأمونيوم الأصفر ، وإلا فيضاف مزيد من الصودا الكاوية .

٤ ـ يضاف نقطة دليل فينولفثالين ثم نقط بحامض كبريتيك ٠,١ عياري من السحاحة لتقدير كمية الصودا الكاوية الزائدة عما لزم لذوبان الراسب ، ومنها نعلم كمية الصودا الكاوية المذيبة للراسب .

٥ ـ ١ مل عياري من الصودا الكاوية ≡٠,٠٠١٣٤٩ جم فوسفور

≡٠,٠٠٣٠٨٨ جم خامس أكسيد الفوسفور

هذا ويجرى تقدير الفوسفور ضوئياً في مستخلص الرماد بأخذ ٢ مل منه + ٣ مل دليل مورجان والرج ، ثم إضافة ٢ مل موليبدات أمونيوم (٢,٥ ٪) + ١ مل محلول هيدروكينون (٠,٥ ٪) ، والرج واتركه ٥ دقائق لتطوير اللون الأخضر ، ثم أضف ٢ مل كربونات كبريتيت (٠,٥ ٪) باحتراس والرج وتترك ٥ دقائق لظهور لون أزرق ، تقدر كثافته الضوئية على ٦٨٠ نانومتر وذلك ضد محلول قياسي .

أو أن يضاف ٥ مل مستخلص عينة إلى ١ مل حمض كبريتيك ١٠ عياري + ١ مل موليبدات أمونيوم ٢,٥ ٪ + ١مل يوديد بوتاسيوم ٢٠ ٪ (تحتوي ٠,٥ ٪ كربونات صوديوم). ضع الأنابيب في حمام ماء يغلي ١٥ دقيقة ثم برد في حمام ثلجي ، ثم أضف بكفاية كبريتيت صوديوم ٠,٥ ٪ حديث التحضير لإزالة لون اليود . انقل إلى دورق معياري ٥٠ مل ، وأكمل إلى العلامة ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٦٠٨ – ٧٥٠ نانومتر .

الفسفور ضوئيا Phosphorus (P) :

١ ـ تحضر العينة بالترميد الجاف للعينات العضوية (بترميد ٢,٥ جم عينة بعد إضافة ١ جم كربونات كالسيوم وذلك على ٥٥٠°م) ، أو الترميد الرطب للعينات المعدنية والسائلة (١جم في دورق كلداهل + ٢٠ مل حمض كبريتيك مركزا مع الرج لمنع لصق العينة بجدران الدورق ، الغليان ١٠ دقائق ، برد ثم أضف ٢ مل حمض نيتريك مركزاً ثم اغل ، وكرر إضافة حمض النيتريك حتى يصير المحلول رائقاً ، برد وأضف ماء بحذر) .

٢ ـ يعمل مستخلص رماد كما سبق ذكره آنفاً (وبالنسبة للمهضوم الرطب يكمل إلى

حجم معلوم ويرشح) ، ويخفف المستخلص ليصير تركيز الفوسفور أقل من ٤٠ ميكروجرام/ مل .

٣ ـ ينقل ١٠ مل من مستخلص العينة إلى أنبوبة ذات سدادة ، ثم أضف ١٠ مل من محلول موليبدو ڤانادات (يذاب ٢٠ جم موليبدات أمونيوم في ماء ، ثم يذاب في إناء آخر ٠,٤٧ جم ڤانادات أمونيوم في ماء ، ثم يخلطا معاً ، وحمض بحمض نيتريك مركزاً ١٤٠مل ، وخفف إلى لتر) يحضر طازجاً .

٤ ـ اخلط واتركها ١٠ دقائق على ٢٠°م ، ثم قدر الامتصاص الضوئي على ٤٣٠ نانومتر ضد تجربة خاوية من ١٠ مل دليل موليبدو ڤانادات مع ١٠ مل ماء .

٥ ـ يجرى عمل منحنى قياسي من تركيزات مختلفة (٥، ١٠، ٢٠، ٣٠، ٤٠ ميكروجرام فوسفور / مل) ومنه يستنتج كمية فوسفور العينة ، والتي يعبر عنها كتركيز مئوي من العينة .

الفيتات (فوسفور فيتات) :

يمكن التقدير الضوئي لفوسفور الفيتات في حدود ١,٥ – ١٥ ميكروجرام ولتركيز منخفض ٣ ميكروجرام / مل من مستخلص الحبوب النجيلية ومنتجاتها إذ يرسب حمض الفيتيك بمحلول حديديك حمضي معلوم المحتوى من الحديد فيكون الانخفاض في حديد الرائق مقياساً لحمض الفيتيك . فتستخلص العينة بحمض الهيدروكلوريك ٠,٢ ع ، ويؤخذ ٠,٥ مل من المستخلص في أنبوبة اختبار ذات سدادة ويضاف إليها ١ مل من محلول الحديديك ٠,٢ جم كبريتات حديديك أمونيوم في ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ٢ ع ويكمل إلى لتر بالماء) .

ويتم الخلط ثم توضع في حمام ماء يغلي ٣٠ دقيقة . برد في ماء مثلج لمدة ١٥ دقيقة ثم اخلط محتويات الأنبوبة واطرد مركزيا نصف ساعة ، انقل ١ مل من الرائق إلى أنبوبة أخرى مع ١,٥ مل ٢-٢- بيبريدين (١٠ جم بيبريدين + ١٠ مل حمض ثيوجليكوليك وأكمل بالماء إلى لتر) وقدر الامتصاص على ٥١٩ نانومتر ضد بلانك من الماء . تقارن النتيجة بنتائج امتصاص تركيزات متدرجة من محلول قياسي لحمض الفيتيك (ملح صوديومي بتركيز ٠,١٥ جم صوديوم فيتات في ١٠٠ مل ماء ثم يعمل منه تركيزات في حمض هيدروكلوريك ٠,٢ ع) .

الفوسفور الكلي والفوسفوليبيدات في السيرم :

لتقدير الفوسفور الكلي يتم ترسيب الفوسفوليبيدات بحمض ثلاثي كلورو خليك ، ثم أكسدتها إلى فوسفات بحمض فوق كلوريك Perchloric وفوق أكسيد الهيدروچين . ثم تكون الفوسفات لوناً معقداً مع الموليبدات والڤانادات في وجود حمض النيتريك . وللتقدير

يؤخذ ١ مل عينة (سيرم أو بلازما) + ٢ مل حمض ثلاثي كلورو خليك (١,٢ مول/لتر)، وتخلط جيداً ثم تطرد مركزيا ١٠ دقائق بعد تركها تستقر ١٠ دقائق على ٢٠-٢٥°م. أجر الخطوات التالية لتقدير الفوسفور الكلي وفوسفور الفوسفوليبيدات بأخذ الحجوم التالية :

	فوسفور الفوسفو ليبيدات (في نفس أنبوبة الطرد المركزي السابقة على الراسب)	فوسفور كلي (أنبوبة اختبار)	محلول قياسي (أنبوبة اختبار)	مقارنة (أنبوبة اختبار)
عينة	—	٠,١ مل	—	—
حمض بيركلوريك ٧٠٪	٠,٥ مل	٠,٥ مل	٠,٥ مل	٠,٥ مل
محلول قياسي ٠,٥ مجم/١٠٠مل	—	—	٠,١ مل	—
فوق أكسيد هيدروجين ٣٠٪	٠,٢ مل	٠,٢ مل	٠,٢ مل	٠,٢ مل

اخلط كل أنبوبة ، وضعهم في حمام برافين أو زيت سيليكون على ٢٠-٢٥°م ، وسخن إلى ١٨٠-٢٠٠°م ، ثم اتركها ١٥ دقيقة على هذه الحرارة (إذا لم تكن أنبوبة الطرد المركزي رائقة المحتويات فبردها وأضف ٠,٢ مل فوق أكسيد هيدروجين أخرى ، وأعد الأكسدة ١٥ دقيقة) . بعد أن تبرد الأنابيب أضف إلى كل منها ٢ مل ماء مقطراً + ١ مل ڤانادات أمونيوم (٢١ ملي مول / لتر في حمض نيتريك ٠,٢٨ عياري) + ١ مل موليبيدات أمونيوم (٤٠ ملي مول / لتر في حمض كبريتيك ٢,٥ عياري) ، واخلط وبعد ١٠ دقائق قدر الكثافة الضوئية على ٤٠٥ نانومتر ، واحسب تركيز الفوسفور الكلي وفوسفور الفوسفوليبيدات = $\frac{\text{قراءة العينة} \times \text{س}}{\text{قراءة المحلول القياسي}}$ حيث س تركيز المحلول القياسي ٥ مجم / ١٠٠ مل أو ١,٦١ ملى مول / لتر .

ولتحويل فوسفور الفوسفوليبيدات إلى فوسفوليبيدات يضرب فوسفور الفوسفوليبيدات (من قراءة أنبوبة الطرد المركزي بعد الترسيب بحمض ثلاثي كلوروخليك) × ٢٥ . والقيم المتوقعة للفسفوليبيدات كفوسفور ٦ - ١٠ مجم / ١٠٠ مل (١,٩٤ - ٣,٢٣ ملي مول / لتر) بينما الفوسفوليبيدات ١٥٠ - ٢٥٠ مجم / ١٠٠ مل سيرم .

ويزيد فوسفور الدم في التهاب الكلى المزمن ، وتتقدم الزيادة بزيادة الفشل الكلوي وتصل قمتها في غيبوبة البولينا Uraemic Coma ، كما يزيد فوسفور الدم بنقص نشاط غدد

جارات الدرقية . ويقل فوسفور الدم في لين العظام وأمراض العظام وبالحقن بالأنسولين.

الفوسفور غير العضوي في السيرم والبول (بدون محلول قياسي) :

يقدر الفوسفور على طول موجة ٤٠٥ نانومتر بالتفاعل مع الموليبيدات والفانادات في حمض نيتريك لتعطي معقداً ملوناً .

فيؤخذ ٠,٢ مل عينة (سيرم أو بلازما ، أو بول مخفف ١+١٩ بالماء المقطر) ويرسب البروتين فيها بإضافة ٢ مل حمض ثلاثي كلورو خليك (١,٢ مول / لتر) ، واخلط واتركها ١٠ دقائق على ٢٠-٢٥°م ، اطرد مركزيا ١٠ دقائق، وانقل من الرائق إلى أنابيب اختبار جافة ١ مل للتقدير ؛ إذ يضاف إليها ١ مل ڤانادات أمونيوم (٢١ ملي مول / لتر في حمض نيتريك ٠,٢٨ عياري) + ١ مل موليبدات أمونيوم (٤٠ ملي مول / لتر فى حمض كبريتيك ٢,٥ عيارى) (وللمقارنة يؤخذ ١ مل حمض ثلاثى كلوروخليك + ١ مل ڤانادات + ١مل موليبيدات)قدر الكثافة الضوئية بعد الخلط والترك ١٠ دقائق ، واحسب تركيز الفوسفور غير العضوي بضرب قراءة العينة × ٤٢,٢ = مجم / ١٠٠ مل سيرم

× ١٣,٦ = ملي مول / لتر سيرم

× ٢٧٣ = ملي مول / لتر بول

× ٨,٤٥ = جم / لتر بول

والقيم المتوقع الحصول عليها ٢,٥ - ٧ مجم / ١٠٠ مل سيرم

٠,٨١ - ٢,٢٦ ملي مول / لتر سيرم

٠,٣ - ١,٠ جم / ٢٤ ساعة بول

٩,٦٩ - ٣٢,٣ ملي مول / ٢٤ ساعة بول

المواد الصلبة في صفار البيض :

يؤخذ ١٠ جم عينة ، وتستخلص في جهاز سوكسلت باستخدام ١٠٠ مل ميثانول لمدة ساعتين . اسحب الميثانول ، ثم أضف إلى العينة ١٠٠ مل أخرى من الميثانول واستخلص ساعتين أخريين . اجمع طبقات الميثانول وبخرها حتى الجفاف ، وقدر فيها المحتوى الفوسفوري ، ومنه تحسب جوامد صفار البيض = خامس أوكسيد الفوسفور × ٥٦ بينما وزن البيض المجفف = جوامد صفار البيض × ١,٤٨ .

وبضرب الفوسفور × ٢٥,٥ نحصل على المحتوى من اللسيثين .

٨ - العناصر الدقيقة Trace Elements :

هي عناصر غير عضوية معظمها معدنية ، وتوجد في المواد الغذائية بكميات أقل من ٥٠ مجم / كجم ، ولها أهمية غذائية أو من الناحية التوكسيكولوجية (التسمم) . فالعناصر ذات الأهمية والضرورية تشمل الكوبلت والنحاس والحديد واليود والمنجنيز والزنك.

بينما العناصر غير الغذائية تشمل الألومونيوم والبروم والكروم والنيكل والقصدير ، والتي لها تأثيرات ضارة كذلك مثل الزرنيخ والأنتيموني والكادميوم والفلور والرصاص والزئبق والسلنيوم حتى ولو كانت بتركيزات أقل من ١٠-٥٠ مجم / كجم . إلا أن العلاقة معقدة؛ إذ إن بعض العناصر مثل النحاس والزنك رغم أهميتها لعمليات الحياة في حالة وجودها بآثار قليلة ، إلا أنها إذا ابتلعت بكميات كبيرة تسبب القيء . وتهتم التحليلات الروتينية بالعناصر التي وضعت لها توصيات بحدود وجودها فى الأغذية كالزرنيخ والنحاس والرصاص والقصدير والزنك .

وجود العناصر الدقيقة الأخرى غير المرغوبة قد يرجع للتلوث البيئي ، كما في السمك نتيجة ابتلاعه ماء ملوثا بمخلفات صناعية وزراعية وآدمية ، فتتراكم في الكبد وغيره من أجزاء جسم الحيوان . كما تحتوي المصادر النباتية على الأتربة وبقايا المبيدات المستخدمة في وقاية المحاصيل وعلاجها . وتحتوي المواد المصنعة على آثار من التصنيع والإعداد والتعبئة سواء من القصدير أو الألومنيوم أو الحديد المجلفن أو الطلاء وغيرها كثير .

ويحتوي جسم الحيوان تام النمو من المعادن النادرة على التركيزات التالية بالمليجرام / كيلو جرام وزن جسم :

حديد	نحاس	منجنيز	زنك	موليبدنم	يـــود
٦٠-٧٠	١,٥-٢,٥	٠,٢-٠,٣	٢٠-٣٠	١,٥	٠,٣ - ٠,٤

وهناك فارق كبير جداً بين الكميات التي تؤدي إلى التسمم والتي يحتملها الحيوان كما يوضح ذلك الجدول التالي (الكميات مجم / كجم علف جاف) :

المعدن	الحيوان	ما يمكن احتماله	ما يسبب التسمم
النحاس	البقر	٥٠	١١٥
	الغنم	٥	١٢,٥
	خنزير	٨٠	٥٠٠
المنجنيز	المجترات	١٠٠٠	٢٦٠٠
الزنك	بقر	٥٠٠	٩٠٠
الموليبدنم	بقر	٥	١٠
	غنم	٢	٥
سلنيوم	بقر وخنزير	٢	٥ - ٤٠
الحديد	المجترات	٥٠٠	١٠٠٠
اليود	مجترات	٨ - ٢٠	٥٠ - ١٠٠

أ ــ الحديد Iron (Fe) :

١ ـ يضاف إلى مستخلص الرماد ١٠ مل حامض نيتريك مركزاً ، ويغلي لمدة عدة دقائق .

٢ ـ يبرد المحلول ، وتضاف تدريجياً كمية زائدة من الأمونيا السائلة (١ : ١) حتى تحصل على رائحة نشادر حقيقية ، وترفع درجة الحرارة إلى درجة الغليان . يترك الراسب المتكون ليستقر في القاع .

٣ ـ يرشح الرائق ، ثم ينقل الراسب كمياً إلى ورقة الترشيح ، ويغسل الراسب ٣-٤ مرات بالماء الساخن (يمكن حفظ الراشح لتقدير الكالسيوم والماغنسيوم) .

٤ ـ يذاب الراسب بصب حامض كبريتيك (١٢,٥ ٪) على ورقة الترشيح وجمع الراشح في دورق مخروطي .

٥ ـ يضاف ٥-١٠ جم مسحوق زنك خالي الحديد إلى الدورق المخروطي ، ويترك ليخرج الهيدورچين (أو يمكن التسخين الهين للمساعدة على إتمام التفاعل) ثم يترك حتى يصبح المحلول رائقاً .

٦ ـ يرشح المحلول في دورق يحتوي على ١٠ مل حامض كبريتيك (١٢,٥ ٪) ، ثم تغسل ورقة الترشيح بالماء البارد ، وتنقط محتويات الدورق بمحلول برمنجنات بوتاسيوم ٠,١ عياري .

٧ ـ ١ مل عياري برمنجنات بوتاسيوم = ٠,٠٠٥٥٨٤ جم حديد .

كما يقدر الحديد في مستخلص الرماد باستخدام مطياف الامتصاص الذري على طول موجة ٢٤٨,٣ نانومتر ، مع عمل منحنى قياسي لمحاليل مختلفة التركيز من الحديد . ونفس المستخلص يقدر فيه بجانب الحديد كذلك المنجنيز والزنك على أطوال موجات ٢٧٩,٥ ، ٢١٣,٨ نانومتر على الترتيب .

كما يمكن تقدير الحديد ضوئياً بأخذ ١٠ مل مستخلص رماد في دورق معياري ٢٥ مل مع ١ مل محلول ٢ ٪ ثاني أكسيد كبريت ، وينقط بخلات صوديوم (٢ عياري) باستخدام ورق دليل أحمر كونجو (يتحول اللون من الأزرق إلى البنفسجي) . أضف ٢ مل محلولاً مائياً ٠,٢٥ ٪ أورثو فينانثرولين Phenanthroline – O ، وأكمل إلى العلامة ، ويترك ليلة لتطوير اللون ، ثم تقرأ الكثافة الضوئية على ٥٢٠ نانومتر ضد مقارنة معدة بنفس الأسلوب من محاليل التقدير ، كما يجرى ما سبق على محلول قياسي من ٠,٧٠٢٤ جم كبريتات أمونيوم حديدوز سداسي الماء في ماء ، مع إضافة نقطتين من حمض هيدروكلوريك وخفف إلى لتر ، وخذ منه ٥٠ مل خففها إلى لتر (١ مل = ٠,٠٠٥ مجم حديد) .

أو أن يقدر الحديد بتحويل الحديدوز إلى حديديك بمادة مؤكسدة ، مثل فوق كبريتات البوتاسيوم أو فوق أكسيد الهيدروچين ، ثم المعادلة بالثيوسيانات لتكوين لون أحمر من ثيوسيانات الحديديك التي تقاس شدة لونها على طول موجة ٤٨٠ نانومتر كما يلي :

١ ـ استخدم ٥ مل من مستخلص الرماد + ٠,٥ مل حمض كبريتيك مركزاً + ١ مل فوق سلفات بوتاسيوم مشبعة (٧ – ٨ جم / ١٠٠ مل ويحفظ في ثلاجة) + ٢ مل ثيوسيانات بوتاسيوم ٣ مولر (١٤٦ جم / ٥٠٠ مل ماء ، ورشح وأضف ٢٠ مل أسيتون للحفظ) ، وأكمل الحجم إلى ١٥ مل بالماء ، وقدر الكثافة الضوئية على ٤٨٠ نانومتر .

٢ ـ أجر مقارنة من ٥ مل ماء + ٠,٥ مل حمض كبريتيك + ١ مل فوق كبريتات بوتاسيوم + ٢ مل ثيوسيانات بوتاسيوم واضبط الجهاز على هذه المقارنة على ١٠٠٪ عبور أو صفر امتصاص .

٣ ـ أجر كذلك قياس محلول قياسي (٠,٧٠٢ جم كبريتات أمونيوم حديدوز سداسي الماء في ١٠٠ مل ماء + ٥ مل حمض كبريتيك مركزاً ، ودفئ ثم أضف محلول برمنجنات بوتاسيوم مركزة بالتنقيط حتى النقطة التي تنتج لوناً ثابتاً . انقل إلى دورق معياري لتراً ، وأكمل بالماء ، هذا المحلول يحتوي ١ مل منه على ٠,١ مجم حديد فى صورة مؤكسدة حديديك) بأخذ ١ مل من المحلول القياسي + ٤ مل ماء + ٠,٥ مل حمض كبريتيك + ١ مل محلول فوق كبريتات بوتاسيوم + ٢ مل ثيوسينات بوتاسيوم .

٤ ـ احسب تركيز الحديد مجم / ١٠٠ جم =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times 2 \times \text{حجم مستخلص الرماد الكلي}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times \text{وزن العينة المرمدة}}$$

ب ـ النحاس Copper (Cu) :

المستوى العام المسموح بوجوده من قبل لجنة المعايير الغذائية الأمريكية FSC في معظم الأغذية هو ٢٠ جزء في المليون . والجرعة العالية من النحاس تسبب التقيؤ ، رغم أنه هام للنمو ، وتكوين الهيموجلوبين في الحيوانات . وجوده حتى بمستوى منخفض ٢ مجم / كجم يعمل كعامل مساعد في الأكسدة ويسبب طعماً شحميا Tallowy Flavour للبن والزبدة، مما يسيء لجودة الحفظ. ويساعد النحاس في هدم ڤيتامين (ج) في النباتات . ومن مصادر تلوث الأعلاف بالنحاس هو استخدام المبيدات الفطرية النحاسية Copper Fungicides أثناء الزراعة .

ولتقدير النحاس يناسبه كلتا الطريقتين في الهضم سواء رطباً أو جافاً ، والاستخلاص في حمض هيدروكلوريك أو نيتريك . وللنحاس عديد من طرق التقدير الضوئية أو بمطياف الامتصاص الذري .

تقدير النحاس ضوئيا :

١ ـ يعد مستخلص رماد كما سبق وصف خطواته (على أن يكون الترميد على ٤٥٠ْم) ، وينقل هذا المستخلص إلى قمع فصل ، ويضاف إليه ١٠ مل محلول سترات إدتا (أذب ٢٠ جم سترات أمونيوم + ٥ جم ملح ثنائي صوديوم إيثلين دي أمين تترا حمض خليك EDTA في ماء وخفف إلى ١٠٠ مل) + نقطتان دليل أزرق ثيمول (أذب ٠,١ جم أزرق ثيمول في ٢,١٥ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,١ عياري ، وخفف بالماء إلى ١٠٠ مل) ومحلول هيدروكسيد أمونيوم (٦ عياري) حتى يصير لون المحلول أخضر أو أخضر مزرق .

٢ ـ أضف ١ مل محلول كربامات (أذب ١ جم صوديوم دي إيثيل دي ثيو كاربامات في ماء وخفف إلى ١٠٠ مل ، احفظ المحلول من الضوء في ثلاجة ، ولا يستخدم بعد أسبوع من تحضيره) . أضف من سحاحة ١٥ مل رابع كلوريد كربون .

٣ ـ سد القمع ، ورجه بشدة لمدة دقيقتين ، ثم اتركه يكون طبقات ، ثم ضع قطعة قطن في ساق القمع ، واترك طبقة رابع كلوريد الكربون تترشح على خلية سبكتروفوتومتر ، مع تجنب تعريض المحلول للضوء . قدر الكثافة الضوئية في الحال على ٤٣٦ نانومتر ضد مقارنة من رابع كلوريد الكربون . مع عمل تجربة خاوية من العينة بنفس الخطوات السابقة.

٤ ـ قدر كمية النحاس من منحنى قياسي ، بعمل عدة أقماع فصل بكل منها كميات متدرجة من محلول قياسي للنحاس (٣٩٣ مجم كبريتات نحاس خماسية الماء تذاب في ١٠٠ مل حمض كبريتيك ٢ عياري وتخفف إلى لتر بالماء ، ثم يؤخذ منها ٥ مل وتخفف إلى ٢٥٠ مل بحمض الكبريتيك ٢ عياري مباشرة قبل التقدير ، ١ مل ≡ ٢ ميكروجرام نحاساً) وحمض كبريتيك كالتالي :

محلول قياسي للنحاس	صفر	١	٢,٥	٥	١٠	١٥	٢٠	٢٥	مل
حمض كبريتيك ٢عياري	٢٥	٢٤	٢٢,٥	٢٠	١٥	١٠	٥	صفر	مل

ويجرى عليها ما سبق من خطوات كما في العينة ، وتقاس الكثافة الضوئية لهذه المحاليل ، وتوقع ضد تركيزاتها على منحنى قياسي لحساب محتوى النحاس مجم / كجم عينة .

هذا ويقدر النحاس باستخدام مطياف الامتصاص الذري في مستخلص الرماد وعمل منحنى وذلك على طول موجة ٣٢٤,٨ نانومتر .

ج ـ الزنك Zinc (Zn):

الحد المسموح بوجوده من الزنك في الأغذية لا يتعدي ٥٠ مجم / كجم ، ولكنه يزيد عن ذلك أحياناً في الرنجة والمحار والقشريات والحبوب وسقط الحيوانات Offals . ولتقدير

الزنك يتم ذلك بأكسدته رطباً (أي بالأحماض) ، أو بالترميد الجاف سواء على ٥٥٠ْم أو ٤٥٠ْم لمدة ليلة لتقديره عادة بمطياف الامتصاص الذري وللتقدير الضوئي للزنك تجرى الخطوات التالية :

١ ـ تهضم عينة بالأكسدة الرطبة ، ويؤخذ حجم معلوم من مستخلصها ، ويضاف إليه نقطتان من دليل أحمر ميثيل + ١ مل محلول كبريتات نحاس (٨ جم كبريتات نحاس خماسية الماء في ماء ، وأكمل إلى لتر ١ مل ≡٢ مجم نحاساً) . عادل حمض الكبريتيك بهيدروكسيد أمونيوم مركزة . أضف زيادة من حمض هيدروكلوريك مركزا لجعل المحلول ٠,١٥ عياري تقريباً (من هذا الحمض أي حوالي ٠,٥ مل حمضاً مركزاً لكل ٥٠ مل محلول) . مرر غاز كبريتيد هيدروجين في المحلول حتى تمام الترسيب . رشح على كأس ٢٥٠ مل ، واغسل الدورق وورقة الترشيح ٣-٤ مرات بالماء . اغل الراشح حتى تزول رائحة الكبريتيد ، ثم أضف ٥ مل ماء بروميد مشبعاً ، واستمر في الغليان لطرد البروميد . برد ، عادل بهيدروكسيد الأمونيوم باستخدام دليل الفينول الأحمر . حمض بحمض هيدروكلوريك ٥٪ . خفف إلى حجم معين .

٢ ـ لفصل النيكل والكوبلت يؤخذ ٢٠ مل في قمع فصل ١٢٥ مل ، ويضاف إليها ٥ مل محلول سيترات أمونيوم (أذب ٢٢٥ جم سيترات أمونيوم في ماء مع نقط من أحمر فينول PH ٧,٤ ، عادل بالأمونيا ، أضف ٧٥ مل زيادة وأكمل إلى لترين ، استخلص هذا المحلول مباشرة قبل الاستخدام بإضافة (ديثيزون ، واستخلص برابع كلوريد كربون حتى تصير طبقة المذيب خضراء فاتحة رائقة ، أزل الزيادة من الديثيزون بتكرار الاستخلاص برابع كلوريد الكربون ، أزل الديثيزون تماماً وإلا سيفقد الزنك أثناء فصل الكوبلت والنيكل) + ٢ مل دي ميثيل جليوكسيم (أذب ٢ جم في ١٠ مل أمونيا + ٢٠٠ - ٣٠٠ مل ماء ، رشح وخفف إلى لتر) + ١٠ مل ألفا ـ نيتروزو ـ بيتا ـ نافثول (أذب ٠,٢٥ جم في كلوروفورم وأكمل إلى ٥٠٠ مل) ورج دقيقتين . اسكب المذيب واستخلص الطبقة المائية بالكلوروفورم (١٠ مل) لإزالة بقايا ألفا ـ نيتروزو ـ بيتا ـ نافثول ، واسكب طبقة المذيب.

٣ ـ لفصل الزنك وتقديره تؤخذ الطبقة المائية بعد إزالة النيكل والكوبلت (PH ٨,٠ - ٨,٢) ، ويضاف إليها ٢ مل ديثيزون (٣٠ مجم في ٢ مل أمونيا + ١٠٠ مل ماء ويستخلص مراراً برابع كلوريد الكربون حتى تصير طبقة المذيب خضراء فاتحة رائقة ، فاسكب طبقة المذيب ورشح الطبقة المائية على ورق ترشيح خالي الرماد ، يعد المحلول طازجاً أولاً بأول) + ١٠ مل رابع كلوريد كربون، ورج دقيقتين . اسمح بفصل الطبقات، واهمل الطبقة المائية تماماً بسحبها بماصة، اغسل جوانب قمع الفصل بماء (٢٥ مل) ، واسحبه ثانية بدون رج . أضف ٢٥ مل حمض هيدروكلوريك ٠,٠٤ عياري ، ورج دقيقة لنقل الزنك إلى الطبقة المائية الحامضية . اسحب المذيب وأهمله ، ثم أضف للقمع ٥ مل

محلول سيترات أمونيوم + ١٠ مل رابع كلوريد كربون ، ثم أضف ١,٥ مرة قدر حجم الديثيزون المتطلب لاستخلاص ٢٠ ميكرو جرام زنك ، ورج دقيقتين ، واترك لفصل الطبقات . اسحب طبقة رابع كلوريد الكربون ، وخفف ٥ مل منها بواسطة ١٠ مل رابع كلوريد كربون ، وقدر الكثافة الضوئية على ٥٤٠ نانومتر .

٤ ـ محلول قياسي (من ٠,٥ جم زنك نقي تذاب في حمض هيدروكلوريك مخفف (٠,٠٤ عياري) ويخفف إلى لتر ، وللاستعمال يخفف ١٠ مل منه إلى لتر بحمض الهيدروكلوريك المخفف (١ مل ≡ ٥ ميكروجرام زنكاً)) يؤخذ منه ٤ مل في قمع فصل، وتخفف إلى ٢٥ مل بحمض هيدروكلوريك مخفف + ٥ مل سيترات أمونيوم + ١٠ مل رابع كلوريد كربون + ٠,١ مل ديثيزون ورج دقيقتين . أضف ٠,١ مل ديثيزون أخرى ورج ، واستمر في الزيادة حتى يصير لون الطبقة المائية صفراء باهتة ، سجل الحجم المأخوذ من الديثيزون (لاستخدامه في العينات خطوة رقم ٣) . اسحب طبقة رابع كلوريد الكربون، خفف ٥ مل منها بمقدار ١٠ مل رابع كلوريد كربون وقدر الكثافة الضوئية على ٥٤٠ نانومتر .

د ـ الكبريت Sulphurs :

١ ـ يوزن ١ جم من العينة في بوتقة ، ويضاف عليها ٧,٥ مل محلول نترات ماغنسيوم سداسي الماء (٩٥ ٪) بحيث تكون العينة مغمورة في هذا المحلول لتثبيت الكبريت بها ؛ لذا قد تضاف كميات أخرى من المحلول .

٢ ـ يسخن على سخان كهربائي حتى ينتهي التفاعل الناشئ عن التسخين ، ثم تنقل البوتقة للترميد على ٥٠٠°م .

٣ ـ بعد أن تبرد البوتقة ، يضاف إليها حامض هيدروكلوريك مركزا لغمر محتوياتها ، ثم تغلى وترشح محتوياتها ، ويغسل الراسب بالماء المقطر مع استقبال الراشح .

٤ ـ يؤخذ الراشح ويغلي ، ثم يضاف إليه ١٠ مل من محلول كلوريد باريوم (١٠ ٪) بالتنقيط ، مع التقليب المستمر .

٥ ـ يغلى لمدة ٥ دقائق ، ثم يترك في حضان (٤٠°م) لمدة ٥ ساعات .

٦ ـ يرشح مع غسل ورقة الترشيح عديمة الرماد بالماء الذي يغلي (١٥-٢٠ مل) لغسل الراسب من الكلور .

٧ ـ يحرق في بوتقة مثبتة الوزن المعلوم ، ثم تبرد وتوزن ، والفرق بين وزن البوتقة بالراسب والبوتقة فارغة هو وزن كبريتات الباريوم الذي يضرب في ٠,١٣٧٤ للحصول على وزن الكبريت .

هذا ويقدر الكبريت كذلك عن طريق تقدير محتوى الباريوم في المستخلص ، باستخدام

مطياف اللهب على طول موجة ٤٩٣ نانومتر .

هـ ـ اليود (I) Iodine :

أذب ٥٠ جم عينة في ماء مقطر ، وأكمل الحجم إلى ٢٥٠ مل في دورق معياري . رشح ثم خذ ٢٠٠ مل من الراشح وحمضها بحمض كبريتيك باستخدام دليل برتقالي الميثيل . أضف ١ مل ماء بروم مشبع وبضع قطع زجاج أو حجر خفاف ، اغل المحلول حتى يقترب من التبلور ، أعد الذوبان في ماء مقطر . أضف ٢ مل حمض كبريتيك ١ مولر + ٠,٢ جم يوديد بوتاسيوم + نقط من دليل نشا ١ ٪ طازجاً ، ونقط بثيوكبريتات صوديوم ٠,٠٠٥ مولر .

١ مل ٠,٠٠٥ مولر ثيوكبريتات صوديوم ≡٠,٠٠٠١٠٥ جم يود .

و ـ الكوبلت Cobalt :

تجفف العينة على ١٠٠°م ويؤخذ منها ١٠ جم (توزن بالضبط) في دورق كلداهل مع ٨٠ مل حمض نيتريك و ٥ مل حمض بيركلوريك و ٣ مل حمض كبريتيك ويسخن بلطف حتى يبدأ التفاعل فينقل الدورق بعيداً عن الحرارة ويترك ليلة ثم يسخن حتى تتركز العينة إلى ٣ مل ، وقد يضطر إلى مزيد من إضافة حمض النيتريك لإكمال أكسدة المادة العضوية . خفف بالماء ١٠ مل واغل عدة دقائق ثم رشح على بوتقة سليكا ، بخر الماء ثم أذب المتبقيات في ٧,٥ مل حمض سيتريك ٠,٢ ع وخفف إلى ٣٠ مل .

أضف ٥ نقط من دليل أزرق فينول بروم ونقط بالصودا الكاوية ١ ع حتى ظهور لون أزرق مخضر ، انقل إلى قمع فصل وخفف إلى ٥٠ مل لضبط تركيز السيترات إلى ٠,٠٣ ع . استخلص هذا المحلول بالداي ثيزون (٢٠ مل) عدة مرات تركيز ٠,٢ ٪ في كلوروفورم ويكرر الاستخلاص (٣ مرات) حتى تحصل على لون أخضر لطبقة الكلوروفورم ، ثم يغسل المحلول بالكلوروفورم (يمكن تقدير النحاس كميا في مستخلصات الكلوروفورم) . يضبط PH الطبقة المائية إلى ٨,٣ بإضافة نقط من الفينولفثالين وعاير بالصودا المنظمة (٦,١٨٤ جم حمض بوريك + ٣٥,٦٢ جم فوسفات صوديوم أحادية الهيدروجين + ٥٠٠ مل صودا كاوية ١ ع وأكمل إلى لتر بالماء) حتى ظهور أول علامة للون الطوبي الأرجواني (حوالي ٦ مل) . يزال الكوبلت بالاستخلاص بالداي ثيزون (٠,٠٥ ٪ في رابع كلوريد كربون) بمقدار ١٠ مل (٣ مرات) حتى يكون رابع كلوريد الكربون ذا لون أخضر .

مستخلصات رابع كلوريد الكربون تحتوي على كل الكوبلت ، يقطر المذيب وتهضم المتبقيات مع ١ مل حمض نيتريك + ٠,٢ مل حمض كبريتيك + ٠,٥ مل حمض بيركلوريك حتى زوال اللون . تنقل المحتويات إلى بوتقة سليكا ويبخر الماء تماماً ثم توضع

في فرن على ٣٥٠°م لمدة خمس دقائق .

تذاب المتبقيات في ١ مل حمض سيتريك ٠,٢ ع ويضاف ١,٢ مل صودا منظمة + ١ مل نيتروزو – R ٠,٢ ٪ (٣٥ جم نافثول ٣-٦ حمض دي سلفونيك (ملح R) في ٤٠٠ مل ماء + ١٠ مل حمض هيدروكلوريك ويبرد إلى ١٠°م وينقط ببطء ٧ جم نيتريت صوديوم مذابة في ٢٥ مل ماء مع حفظ التفاعل في وسط ثلجي ، ترشح البلورات الصفراء وتغسل بالماء المثلج ثم بالكحول البارد فينتج تركيز أعلى من ٧٠٪ نظريا فيخفف بالماء إلى ٠,٢ ٪) بالتنقيط والرج . اغل دقيقة ثم أضف ١ مل حمض نيتريك، وأعد الغليان دقيقة ثم أضف ٠,٥ مل برومين ٠,٢ ع (ماء مشبع بالبروم ويقدر تركيزه بالمعايرة بالثيوسلفات بعد إضافة المزيد من يوديد البوتاسيوم ثم خفف إلى ٠,٢ ع) إلى المحلول الدافئ واتركه ٥ دقائق . وتزال الزيادة من البروم بالغليان دقيقة . برد وخفف إلى ١٠ مل وقس الكثافة الضوئية للون الأحمر ضد محلول قياسي (كمية كوبلت في ١ مل حمض سيتريك ٠,٢ع + ١,٢ مل صودا منظمة وأكمل كماليه) .

ز ـ الألمونيوم (والحديد) Aluminium (Al) :

١ ـ احرق عينة على ٥٠٠-٥٥٠°م حتى يصير لون المتبقي أبيض تقريباً ، بلل بحمض هيدروكلوريك (٥- ١٠ مل) ، واغل دقيقتين ، وبخر حتى الجفاف ، بلل ثانية بحمض هيدروكلوريك (٥ مل) ، واغل دقيقتين ، أضف ٥٠ مل ماء ، وسخن عدة دقائق . رشح واجمع الراشح .

٢ ـ اغسل الراسب ، وانقله إلى البوتقة ، واغل ٥ دقائق مع محلول كربونات صوديوم مشبعة (٢٠ مل) ، ثم أضف نقطاً من محلول هيدروكسيد صوديوم ١٠ ٪ ، اترك المخلوط يستقر ، ثم رشح وكرر الغليان مع محلول كربونات الصوديوم والترشيح ، واجمع المترشحات القلوية ، وحمضها بحمض هيدروكلوريك (٥ مل) وبخر حتى الجفاف ، ثم أضف ٥ مل هيدروكلوريك أخرى ، وبخر ثم جفف ساعتين على ١١٠-١٢٠°م . بلل المتبقي بحمض هيدروكلوريك (٥-١٠ مل) واغل دقيقتين ، ثم أضف ٥٠ مل ماء وسخن على حمام مائي ١٠-١٥دقيقة ، ورشح خلال ورق ترشيح عديم الرماد أو على بواتق جوتش محروقة ، واغسل بالماء واحرق على ٥٠٠-٥٥٠°م .

٣ ـ أضف السليكا (المتبقية من خطوة رقم ٢) إلى مستخلص الرماد (خطوة رقم١) ، ثم أضف نقطاً من حمض نيتريك ، أو فوق أكسيد الهيدروجين لأكسدة الحديد (مع إضافة ٠,٥ جم فوسفات أمونيوم إذا لم يكن المحلول محتوياً على كفاية من الفوسفات) ، وقلب ثم خفف بالماء إلى ٥٠ مل . أضف نقطاً قليلة من دليل أزرق الثيمول (٠,١ ٪ في ماء وأضف هيدروكسيد صوديوم ٠,١ عياري حتى يتحول لون الدليل

إلى الأزرق وأكمل إلى ١٠٠ مل) ثم أضف هيدروكسيد أمونيوم حتى يتحول المحلول إلى اللون الأصفر .

٤ ـ أضف ٠,٥ مل حمض هيدروكلوريك + ٢٥ مل محلول خلات أمونيوم ٢٥٪ وقلب واترك ساعة على حرارة الغرفة . رشح واغسل ١٠ مرات بمحلول نترات أمونيوم ٥٪ . احرق على ٥٠٠-٥٥٠م، ثم زن كفوسفات حديديك $Fe\ PO_4$ وفوسفات ألمونيوم $Al\ PO_4$.

٥ ـ أضف ٤ جم مخلوط (١:١) كربونات صوديوم وكربونات بوتاسيوم إلى البوتقة ، واصهر ثم برد وأضف ٥ مل حمض كبريتيك، وسخن حتى تتصاعد أبخرة الكبريتيت SO_3 . برد وانقل إلى دورق هضم وأضف ماء، واهضم حتى يروق المحلول . اختزل الحديد بالزنك، وبرد وعاير ببرمنجنات البوتاسيوم ٠,١ عياري . واحسب ٪ حديداً أو أكسيد حديديك $Fe_2\ O_3$ ، ثم احسب كفوسفات حديديك ، واطرح من فوسفات الحديديك وفوسفات الألمونيوم سابقة التقدير للحصول على وزن فوسفات الألمونيوم وسجل كأكسيد ألمونيوم $Al_2\ O_3$.

حـ ـ الفلور Fluorine (F) :

١ ـ تحرق العينة (مع أوكسيد كالسيوم ، أو هيدروكسيد صوديوم في إيثانول لجعلها قلوية للفينولفثالين) على ٥٥٠-٦٠٠م . اصهر الرماد مع ٢ جم هيدروكسيد صوديوم على موقد ، أذب في قليل من الماء ، أضف نقطاً قليلة من فوق أكسيد الهيدروجين ٣٠٪ ثم اغل .

٢ ـ يفصل الفلور بالهضم فى حامض قوي ، في وجود مصدر للسليكا (Salicic Acid) ليتقطر الفلور في صورة حمض فلوسيليسيك Fluosilicic Acid . فتنقل العينة مع حمض الكبريتيك (١:١) إلى جهاز التقطير (كالميكرو كلداهل) الذي يصله بخار من دورق ماء يغلي (يحتوي فينولفثالين وهيدروكسيد صوديوم لدوام قلويته) ، ويستقبل المتقطر من المكثف .

٣ ـ يقدر الفلور في المتقطر بأخذ حجم معلوم منه ويخفف إلى ٢٥ مل ويضاف إليها ٥مل دليل زركونيوم (٠,٢٦٥ جم كلوريد زركونيل ثماني الماء في ٥٠ مل ماء + ٧٠٠ مل حمض هيدروكلوريك مركزا ويكمل إلى لتر ، أو ٠,٤٥ جم دي فوسفات زركونيوم / ١٠٠ مل هيدروكلوريك مركزا) وتخلط وتترك ٣٠ دقيقة قبل قياسها على سبكتروفوتومتر على ٥٧٠ نانومتر .

٤ ـ تقاس الكثافة الضوئية لمحلول قياسي (٢,٢١٠٥ جم فلوريد صوديوم نقي / لتر حمض هيدروكلوريك ٢ عياري (١ مل ≡١ مجم فلور) يؤخذ منها ٥ مل وتكمل إلى ٥٠٠ مل (١ مل ≡١٠ ميكروجرام فلور) وذلك في أواني بولي إيثلين) أجر عليه الخطوة رقم ٢، ٣ .

يمكن كذلك أخذ ١٠مل من متقطر العينة في قمع فصل ، وترج دقيقة مع ١٠ مل محلول زركونيوم (في هكسان) ، ويغسل مرتين بمحلول هيدروكلوريك ٢ عياري (٢×٥ مل) لمدة دقيقة كل مرة ، يعاد استخلاص الفلور بمحلول ٢ مل ترى بيوتيل فوسفات + ١ مل أسيتون + ١٠ مل هيدروكسيد صوديوم (٠,٣٥ عياري) ثم بمقدار ١٠ مل هيدروكسيد صوديوم (٠,١ عياري) لمدة ١٥ دقيقة ، تحمض الطبقة المائية بمقدار ٢ مل حمض هيدروكلوريك ٥ عياري وتخفف إلى ٥٠ مل ، وتقلب وترشح ، ويقدر الفلور ضوئيا مقارنة بمحلول قياسي في حمض هيدروكلوريك ٢ عياري .

ط ـ القصدير Tin (Sn) :

حددت لجنة المعايير الغذائية الأمريكية حدا لوجود القصدير في الأغذية ، لا يتجاوز ٢٥٠ مجم / كجم . ورغم أن محتوى الأغذية المعلبة بالمواصفات الحديثة ينخفض محتواها من القصدير لأقل من ١٠٠ مجم / كجم ، إلا أنه سريعاً ما يذوب الصفيح في الغذاء بوجود الأوكسجين ، أي بفتح المعلبات أو في أول غلقها حتى يستهلك ما بها من أوكسجين ، كما أن الأغذية الحامضية والملحية والمحتوية على الكبريت تهاجم صفائح القصدير . ومن طرق التقدير للقصدير ما يلي :

١ ـ زن وزنة من العينة ، وأكسدها بإضافة ١٠ مل حمض نيتريك مركزا ، واخلط وبعد ١٠ دقائق أضف ٥ مل حمض كبريتيك مركزاً ، واهضم على لهب حتى تظهر أبخرة ثالث أوكسيد الكبريت البيضاء .

٢ ـ برد وأضف ٢٠ مل ماء ، وانقل إلى دورق معياري ٥٠ مل ، وأكمل إلى العلامة واخلط .

٣ ـ اسحب ٢ مل من المحلول إلى دورق معياري ٥٠ مل ، وأضف ٠,٢ مل محلول ٢-٤- دي نيتروفينيل (٠,١ ٪ في إيثانول ٥٠ ٪) ، ثم أضف محلول كربونات صوديوم (١٠ ٪) بالتنقيط حتى أول ظهور لون أصفر .

٤ ـ أضف ٢,٥ مولر حمض هيدروكلوريك بالتنقيط حتى يزول اللون ، ثم أضف زيادة ٥ مل . أضف ٣ مل ثيويوريا (محلولاً مائيا مشبعاً) + ٥ مل محلولاً (٠,٢ ٪ في إيثانول) كويرسيتين quercetin + ٢٥ مل إيثانول .

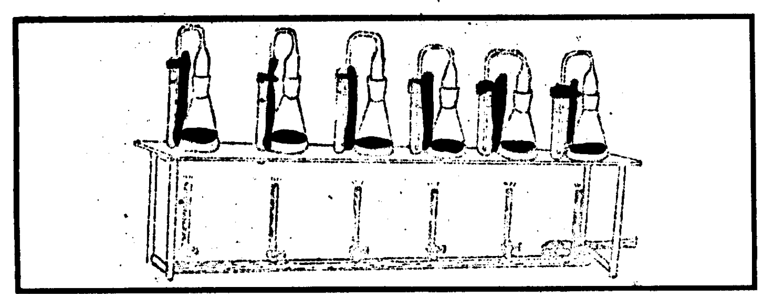
٥ ـ خفف إلى ٥٠ مل بالماء ، واخلط وبعد نصف ساعة قدر الكثافة الضوئية على ٤٣٧ نانومتر ضد مقارنة من المحاليل المستخدمة .

٦ ـ أجر تقدير لمحلول قياسي من القصدير النقي المذاب في حمض كبريتيك مركزاً مغليا .

هذا وهناك طرق أخرى ضوئية ، وطرق عيارية ، وثالثة باستخدام مطياف الامتصاص

الذري . فمن طرق تقدير القصدير الحجمية (العيارية) هي اختزال القصدير (في مستخلص الرماد بالهيدروجين النشوء في جو من ثاني أكسيد الكربون لعزل الأوكسجين) إلى قصديروز Stannous tin ، ومعايرته بيودات البوتاسيوم في وجود يوديد البوتاسيوم .
فتهضم العينة بالأكسدة الرطبة حتى يصير لون المحلول المهضوم بعد برودته أصفر باهتاً أو بنيا فاتحاً ، ثم يضاف ١٠٠ مل فوق أكسيد الهيدروجين (٣٠٪) بالتنقيط ، ثم سخن ثانية حتى تتصاعد الأبخرة ، وكرر إضافة فوق أكسيد الهيدروجين والتسخين حتى يصير المحلول عديم اللون كالماء ، أكمل الحجم إلى ٥٠ مل بالماء، اسحب ٢٠ مل من المستخلص إلى دورق مخروطي ١٥٠ مل وأضف إليه نقطة واحدة من محلول ثلاثي كلوريد الأنتيمون (١,٥ جم في ٥٠ مل حمض هيدروكلوريك ٣ عياري (خفف ٢٩٤,٦ مل من الحمض المركز إلى لتر) وأكمل إلى ١٠٠ مل بالماء) + ٣٠ مل حمض هيدروكلوريك ٣ عياري + حوالي ٠,٣جم ورق ألمونيوم Aluminium Foil ، وصل بسرعة وصلة ٢م زجاج (بسدادة محكمة لسد الدورق) وخروجها إلى أنبوبة اختبار تحتوي على بيكربونات صوديوم ٥٪ ، وسخن الدورق حتى يخرج الغاز ، ثم أبعد اللهب . وعند تمام ذوبان ورق الألمونيوم سخن مرة ثانية واغل حتى يروق المحلول . برد الدورق في ماء مثلج مع استمرار اتصاله بأنبوبة الاختبار . افصل الدورق واغسل جوانبه بحوالي ٤ مل محلولاً طازجاً من يوديد بوتاسيوم (أذب ٠,٢ جم يوديد بوتاسيوم مع ٣ جم بيكربونات صوديوم تذاب في ١٠٠ مل ماء مغلي، ثم أضف نقطاً من حمض هيدروكلوريك ورج) . أضف نقطاً من دليل النشا (١٪ نشا ذائب في ٢٠٪ محلول كلوريد صوديوم) . نقط بسرعة بمحلول يودات بوتاسيوم ٠,٠٠٥ عياري (أذب ٥,٣٥٠٥ جم يودات بوتاسيوم وأكمل إلى لتر بماء بارد سبق غليه، خفف ١٠ مل إلى ٢٠٠ مل) طازجاً إلى نقطة انتهاء التفاعل الزرقاء الثابتة لعدة ثوان . أجر تجربة خاوية من العينة كمقارنة واحسب تركيز القصدير كجزء في المليون .

$$= \frac{\text{(حجم اليودات للعينة–حجم اليودات للمقارنة)} \times \text{عيارية اليودات} \times \text{حجم مهضوم العينة} \times ٥٩٣٥٠}{\text{الحجم المأخوذ للتقدير} \times \text{وزن العينة}}$$



(شكل٣٢) جهاز لتقدير القصدير

ي ـ الزرنيخ Arsenic (As) :

له حد أقصى لوجوده في الأغذية لا يتعدى ١ مجم / كجم ، عدا بعض الأغذية كالسمك والحيوانات البحرية عامة ، وإن وجد في صور مرتبطة عضويا وغير سامة نسبيا .
ولتقدير الزرنيخ يجري التالي :

١ ـ زن عينة ٥ جم جافة + ٥ مل حمض كبريتيك مركزاً + كمية مناسبة من حمض النيتريك المركز ، واهضم لتمام الأكسدة الرطبة .

٢ ـ اضبط الحجم إلى ٥ مل بحمض الكبريتيك ، وانقل إلى دورق كميا بالغسيل لآنية الأكسدة الرطبة بالماء المقطر (٥ مل) ، وسخن لتصاعد الأبخرة ثم برد .

٣ ـ انقل إلى قمع فصل ١٠٠ مل ، وخفف إلى ٥٠ مل بالماء وبرد ، أضف ٢ مل محلولا ٥ ٪ Cupferron+ ١٠ مل كلوروفورم ورج بشدة دقيقتين واترك لفصل الطبقات .

٤ ـ افصل طبقة الكلوروفورم ، واستخلص الطبقة المائية بمقدار ١٠ مل كلوروفورم أخرى وافصلها ، انقل الطبقة المائية إلى دورق وبخر لتصاعد الأبخرة ثم برد ، أضف ٥ مل ماء وثبت مكثفاً على الدورق وسخن ثم أضف ٣ مل ٣٠ ٪ بروميد بوتاسيوم (من مصيدة جانبية بصنبور تصب على الدورق مباشرة) يعقبها ١ مل ماء ، واستمر في التسخين واجمع المتقطر في دورق معياري ٢٥ مل حتى تظهر أدخنة أعلى الدورق الذي به العينة أسفل المكثف .

٥ ـ اجعل محتويات الدورق المعياري قلوية بإضافة أمونيا مركزة في وجود نقطة من دليل الفينولفثالين ، ثم أضف ٣ مل حمض هيدروكلوريك عياري + ٢ مل موليبدات أمونيوم (١ ٪ في حمض كبريتيك ١٠ ٪) + ٢ مل هيدرازين (٠,٠٥ ٪ في ماء) وأكمل إلى علامة ٢٥ مل بالماء .

٦ ـ سخن ١٥ دقيقة في حمام مائي يغلي ، وبرد ١٥ دقيقة ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٨٤٠ نانوتر ضد ماء كمقارنة .

٧ ـ عد تجربة خاوية من العينة بنفس الخطوات السابقة

٨ ـ عدّ محلولاً قياسياً من ١٠ ميكروجرام زرنيخاً في دورق معياري ٢٥ مل ، وأضف ٣ مل حمض هيدروكلوريك عياري + ٢ مل محلول موليبدات أمونيوم + ٢ مل محلول هيدرازين ، وأكمل بالماء إلى العلامة وسخن ١٥ دقيقة ، وبرد لمدة ١٥ دقيقة ، وقدر الكثافة الضوئية كذلك على ٨٤٠ نانومتر .

لاحظ أن الكبفرون Cupferron دليل سام وخطر ، وقد يسبب السرطان فيستخدم بحذر وتركيبه N-Nitroso -N - Phenylhydroxy Lamine Ammonium Salt

ومعروف عن الزرنيخ إضافته في علائق الحيوانات والدواجن بنسب ٩٠–٢٥٠جم / طن علف ، وذلك لفعل مركباته المشابه لفعل المضادات الحيوية في المساعدة على تحسين الحالة الغذائية للحيوان .

ك ــ الرصاص (PB) Lead :

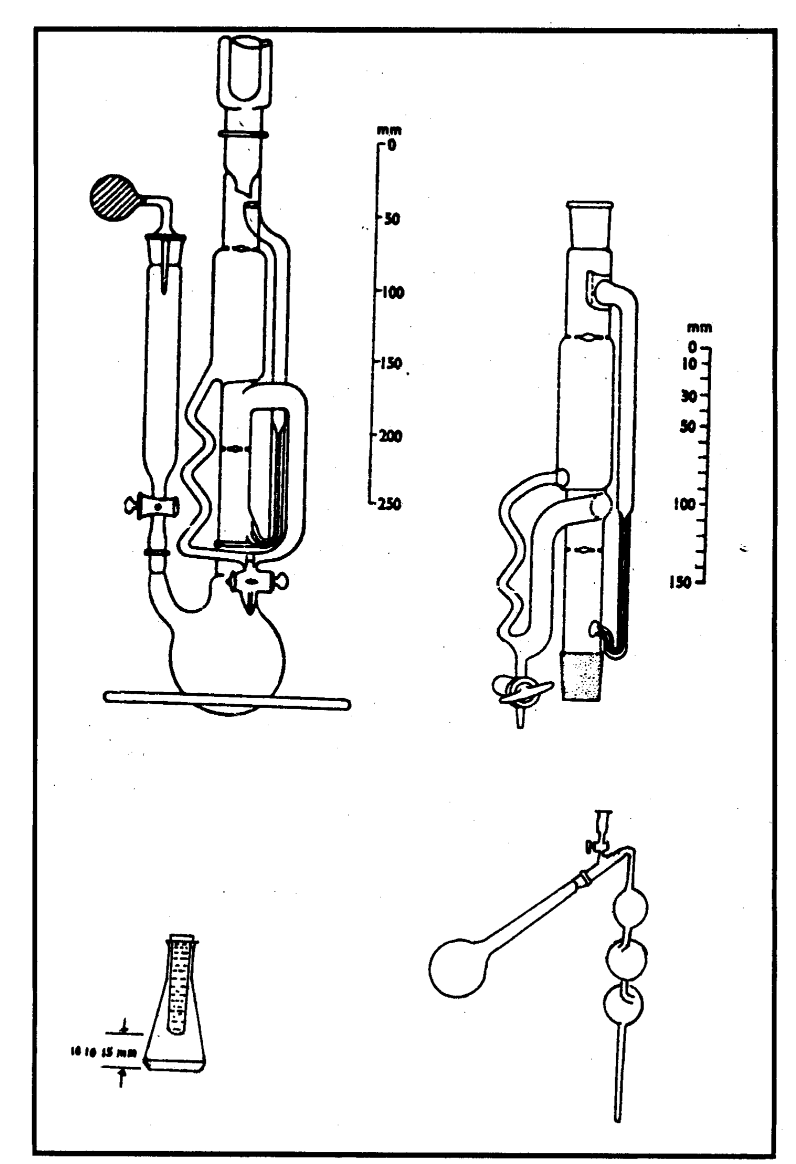
يبلغ الحد العام لوجود الرصاص في الأغذية مدى بسيطاً (٢ مجم / كجم) ، وقد يرتفع من ٢ مجم / كجم للسمك إلى ١٠ مجم / كجم في المحار Shellfish .

ويرجع التلوث بالرصاص من مواد التصنيع كالقصدير والقيشاني والطلاء والمواسير أو من المبيدات . وقد تلوث المياه بالرصاص من مواسير نقل الماء ، أو بتلويث المجاري المائية بالمخلفات المتنوعة . ويقدر الرصاص كالتالي :

١ ــ أكسدة المادة العضوية في العينة سواء بالهضم مع الأحماض ، أو بالترميد على حرارة لا تزيد عن ٥٠٠ْم ، وعمل مستخلص للرماد . خذ حجماً معلوماً من مستخلص الرماد + ٥ مل محلول سيترات أمونيوم (٢٥ ٪ في ماء) + ١٠ مل محلول صوديوم سداسي ميتافوسفات (١٠ ٪ في ماء) + نقط من دليل أزرق ثيمول (٠,٠٤ ٪ بتسخين ٠,١جم أزرق ثيمول مع ٤,٣ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,٩٥ عياري + ٥ مل إيثانول ٩٠ ٪ وبعد الذوبان خفف إلى ٢٥٠ مل بالإيثانول ٢٠ ٪) + كمية كافية من هيدروكسيد أمونيوم مركزة ليعطي لوناً أخضر ــ أزرق (PH ٩– ٩,٥) . برد ثم أضف ١ مل محلول سيانيد بوتاسيوم (١٠ ٪ في ماء ويحضر قبل الاستخدام بيومين على الأقل لأكسدة أي آثار من الكبريتيد) ، وإذا وجد حديد في العينة بكثرة فيضاف ١ مل محلول هيدروكسيل أمين هيدروكلوريد (٢٠ ٪ في ماء) .

انقل المحلول إلى قمع فصل ١٠٠ مل يحتوي على ١٠ مل كلوروفورم ، واغسل بعدة مليلترات ماء ، حجم الطبقة المائية في هذه المرحلة ينبغي أن يكون تقريباً ٥٠ مل . أضف ٠,٥ مل ديثيزون (يحضر محلول ٠,١ ٪ في كلوروفورم ويرشح ويحفظ في ثلاجة ، ثم يرج ٦ مل منه مع ٩ مل ماء + ١ مل هيدروكسيد أمونيوم ٥ مولر . افصل الطبقات واهمل الطبقة السفلى (كلوروفورم) ، واطرد مركزيا الطبقة المائية حتى تروق ، واحفظها طازجة لنفس يوم الاستخدام) . ورج بشدة واترك للفصل . اسحب طبقة الكلوروفورم إلى قمع فصل آخر . أضف إلى المحلول في القمع الأول ٣ مل كلوروفورم + ٠,٢ مل ديثيزون، ورج بشدة ٣٠ ثانية واترك للفصل ، واسحب طبقة الكلوروفورم إلى القمع الثاني.

يجب أن يكون آخر مستخلص كلوروفورمي أخضر اللون ، وإلا يستمر في الاستخلاص بالكلوروفورم والديثيزون ، حتى الحصول على مستخلص كلوروفورم أخضر اللون للتأكد من اكتمال استخلاص الرصاص . أضف ١٠ مل حمض نيتريك مخفف (١ ٪) إلى



(شكل ٣٣) أجهزة مستخدمة في تقطير الزرنيخ

المستخلصات الكلوروفورمية ، ورج بشدة دقيقة واترك للفصل ، ثم اهمل طبقة الكلوروفورم تماماً .

٢ ـ اترك طبقة حمض النيتريك في قمع الفصل (بعد التخلص من طبقة الكلوروفورم) ، ثم أضف إليها ٣٠ مل محلول سيانيد ـ كبريتيت أمونيومي (اخلط ٣٤٠ مل هيدروكسيد أمونيوم (١ : ١٠٠) مع ٧٥ مل كبريتيت صوديوم ٢٪ + ٣٠ مل سيانيد بوتاسيوم ١٠٪ + ٦٠٥ مل ماء) + ١٠ مل كلوروفورم + ٠,٥ مل ديثيزون ، ورج بشدة لمدة دقيقة واترك ليستقر . استبعد قليلاً من طبقة الكلوروفورم ، ثم ضع كتلة صوف ـ قطن في ساق قمع جاف ، وبعد استبعاد القطرات الأولى ، اجمع في خلية Cuvette سبكتروفوتومتر للقياس على ٥١٠ نانومتر ضد مقارنة من الكلوروفورم .

٣ ـ حضر محلولاً قياسياً (من ١,٦ جم نيترات رصاصاً في ماء + ١٠ مل حمض نيتريك مركزاً وخفف إلى لتر ، خذ منه ١ مل وخفف إلى ١٠٠ مل بالماء ، فيكون كل ١ مل ≡ ١٠ ميكروجرام رصاص) وخذ منه ١ مل في قمع فصل ، وخففه إلى ١٠ مل بحمض نيتريك مخفف ١٪ ، وأكمل نفس الخطوات كما تحت خطوة رقم (٢) .

لاحظ أن الكلوروفورم المستخدم في هذه الطريقة عبارة عن ٢٥٠ مل كلوروفورم + ٢٥ مل ماء منها ١ مل سيانيد بوتاسيوم ١٠٪ + ٢٠ نقطة هيدروكسيد أمونيوم ٥ مولر ، واتركها لفصل الطبقات بعد الرج ، استبعد الطبقة المائية ، اغسل الكلوروفورم بالماء ثم رشح .

وخلاف الطرق الضوئية يمكن تقدير الرصاص باستخدام مطياف الامتصاص الذري ذي اللهب Flame Atomic Absorption Spectrophotometer ، وقد يقدر عادة كل من الرصاص والكادميوم في آن واحد في نفس العينة ، لارتباطهما معاً كملوثات بيئية وصناعية ، ويقدران كذلك بدقة متناهية لأي آثار في الأنسجة البيولوجية كذلك باستخدام مطياف الامتصاص عديم اللهب Flameless AAS مباشرة ، كما في قياسهما في الدم والبول بعد ترميد العينات على ٥٠٠°م ، والتقدير على طول موجة ٢١٧ ، ٢٢٨,٨ نانومتر للرصاص والكادميوم على الترتيب ، وفي حالة مطياف الامتصاص الذري ذي اللهب على موجتي ٢٨٣,٣ ، ٢٢٨,٨ للعنصرين على الترتيب باستخدام الأكسدة بلهب هواء وأسيتيلين .

وتحتوي لحوم الأبقار ٠,٢٣ والبيض واللبن ٠,٠٣ بينما تحتوي الأسماك ٠,٥ والمحار ١,٠ مجم / كجم رصاصاً ، ويحتوي الماء على أقل من ٠,٠٢ مجم / لتر رصاص .

ل ـ الكادميوم Cadmium (Cd) :

عنصر سام نسبيا ، يسبب بلعه التهاباً معديا حاداً وقيئاً وإسهالاً . وقد ينشأ التلوث من

الأواني المحتوية على الكادميوم ، أو من الجو وتبادله ، مع الماء ، وبالتالي تتحصل عليه الحيوانات المائية . وفي النباتات يكون مرجعه للتلوث الجوي ، أو للأسمدة الصناعية (سوبر فوسفات) ، أو تسميد الأرض بالروث (سماد بلدي) . ويقدر الكادميوم عادة في اللحوم والأسماك وعيش الغراب عند الشك في تلوثها . وللتقدير تجرى الخطوات العادية للترميد الجاف على ٤٥٠ْم ، والاستخلاص في حمض نيتريك (أو هيدروكلوريك) والتقدير (غالباً مع الرصاص كذلك) على مطياف الامتصاص الذري بالأكسدة في لهب هواء أسيتيلين على طول موجة ٢٢٨,٨ نانومتر (و ٢٨٣,٣ نانومتر للرصاص) . وتحتوي لحوم الأبقار والأغنام ٠,٥٠ ، ٠,٢٧ مجم / كجم على الترتيب من الكادميوم .

م ـ الزئبق Mercury (Hg) :

قد يوجد في الأغذية كالحبوب ، نتيجة استخدام المبيدات الفطرية المحتوية على الزئبق العضوي ، كما تحتوي الأسماك على ميثيل زئبق سام من المخلفات الصناعية التي تصب في المجاري المائية . ورغم أن حد السماح للزئبق في المنتجات الأمريكية يبلغ ٠,٥ مجم / كجم ، فإن من ٥ إلى ٢٥٪ من معلبات التونة الأمريكية والبريطانية يزيد محتواها الزئبقي عن هذا الحد . ويقدر الزئبق كالتالي :

١ ـ أكسد عينة معلومة الوزن مع مخلوط ١ : ١ من حمض نيتريك مركزا وماء مقطرا تحت مكثف عاكس ، ثم أضف مخلوطاً ١٠ : ١ من حمض النيتريك المركز وحمض الكبريتيك المركز (الأخير في ١٠ أجزاء ماء) ، وأكمل الهضم تحت مكثف عاكس .

٢ ـ برد وخفف تقريباً إلى ١ مولر حمض نيتريك ، وأضف من سحاحة ٠,٥ مل ديثيزون مخفف في كلوروفورم (٠,١٪ ثم يخفف ٥ مل منه إلى ٥٠٠ مل) ، ورج ١٠ ـ ١٥ ثانية في قمع فصل ، واترك لفصل الطبقات .

٣ ـ استقبل طبقة الكلوروفورم السفلى على دورق معياري به ٥ مل حمض خليك ٤ مولر ، وكرر إضافات الديثيزون حتى يزول اللون البرتقالي المخضر من طبقة الكلوروفورم وتظهر بلون رمادي .

٤ ـ سجل حجم الديثيزون المستهلك ، وأكمل حجم مستخلصات الديثيزون المتجمعة في الدورق المعياري بالكلوروفورم إلى العلامة (حجم الدورق المعياري يكون هو نفس حجم الدورق المعياري للمحلول القياسي المحضر من ٠,١٣٥٤ جم كلوريد زئبقوز في لتر حمض هيدروكلوريك ٠,١ عياري ، هذا المحلول يحتوي ١ مل منه على ١٠٠ ميكروجرام زئبق (١٠٠ جزء / مليون) ، زيادة التخفيف بأخذ ١٠ مل وتخفيفها إلى لتر تعطى محلولاً يحتوي ١ مل منه على ١ ميكروجرام (١ جزء / مليون)) . رشح على صوف زجاجي على خلية سبكتروفوتومتر لقياس الكثافة الضوئية على ٤٨٥ نانومتر .

٥ ـ قدر الكثافة الضوئية لمحلول قياسي للزئبق أجريت عليه نفس الخطوات السابقة (٢-٤) .

هذا ويمكن إعداد محلول قياسي ثابت لمدة ٦ شهور في حالة حفظه في ثلاجة ، ويحضر من ٠,٦٧٦٧ جم من كلوريد الزئبقيك مذابة في حمض كبريتيك ٥٪ وأكمل إلى لتر ، خذ منه ١ مل ويكمل بمحلول (يحتوي ٩ جم كلوريد صوديوم + ٠,٧٥٤٥ جم ملحاً ثنائي الصوديوم EDTA + ٠,٠٦٣ جم سيستين هيدروكلوريك في ماء) إلى لتر.

كما يمكن تحضير محلول قياسي من ميثيل كلوريد زئبق ٦٠,٠٨ مجم في ١٠٠ مل أسيتون ، ويخفف ١ مل إلى لتر بالماء ، إلا أنه قد يحدث فقد من هذا المحلول للتطاير والترسيب .

هذا ويقدر كذلك الزئبق بمطياف الامتصاص الذري .

ولمزيد من التفصيل يرجى الرجوع إلى المراجع التالية :

– عبد القادر راشد أبو عقادة ، مصطفى محمد أبو النجا (١٩٧٠) : طرق التحليل الغذائي – دار المعارف بالأسكندرية .

- Babko, A.K.&Pilipenko , A.T. (1976) Photometric Analysis , Methods of Determining non- metals . Mir , Moscow .
- Barnett , R.N.et al . (1973) Am.j. Clin Path ., 59:836 .
- Close , W. & Menke , K.H.(1986) Selected topics in animal nutrition, Deutsche Stiftung Fur Internationale Entwicklung , Feldafing , Germany .
- Cooke , J.A. et al . (1976) Envir. Pollut .,11:9 .
- Elveback , L.R. (1970) J.Am . Med . Ass ., 211: 69 .
- Fick,k.R. et al . (1979) Methods of Mineral Analysis for Plant and Animal Tissues 2 nd Ed ., Univ of Florida, USA .
- Gindler , E. & Heath . D.A . (1971) Clin . Chem ., 17 : 662 .
- Gindler , E et al . (1972) Am .J. Clin . Path ., 58 : 376 .
- Haug , W.& Lantzsch,H. - J. (1983) J. Sci Food Agric ., 34:1423.
- Henry , R.J . et al . (1974) Clinical Chemistry Principles and Technics , 2 nd. Ed. Harper & Row, Hagerstown, Md .
- J. AQAC (1975) Journal of the Association of official Agricultural Chemists . 12 th Ed . Washington .

- Katz , M. (1977) Methods of Air Sampling and Analysis . 2 nd Ed. American Public Health Association , Washington .
- Legesson , V. & Andrasko , L. (1979) Clin . Chem ., 25 : 1948 .
- Lees, R. (1975) Food Analysis , 3 rd Ed ., Leonard Hill Books , London.
- Leitgeb, R. (1979) Futtermittelkunde , Vorlesungen , Univ . F. Boku ., Wien .
- Marston , H.R . & Deweg , D.W. (1940) Aust . J.EXP. Biol . Med. Sci ., 18: 343 .
- Merck , E(1974) Klinisches Labor . 12. Auflage Merck, Darmstadt .
- Oser, B.L. (1979) Hawks Physiological Chemstry . 14th Ed ., Tata Me Graw - Hill , New Delhi .
- Ranganna,. (1979) Manual of analysis of frail and vegetable preducts . Tata Mc Graw - Hill , New , New Delhi .
- Ray Sarkar, B.C & Chauhan , U. P.S.(1967) Anal . Biochem ., 20:155 .
- Soliman, M.K. & Abd El Moty , I . (1976) A modern approoch to veterinary clinical & laboratory diagnosis . The Scientific Book Centre Cairo .
- The Feeding Stuffs (Sampling and Analysis) Regulations 1982 (1982) Agriculture 1982 No . 1144 . Her Majestyās Stationery Office London .
- Thonney M.L. (1981) Proc. Cornell Nut . Conf . For Feed Manufacturers .Sgracuse .
- Tietz, N.W. (1976) Fundamentals of Clinical Chemistry., 2nd - Ed Saumders, Philadelphia .
- Varley , H. (1978) Practical Clinical Biochemistry . 4 th Ed., Ar - nold - Heine mann , India .
- Wright , D.A & Davison , A.W. (1975) Envir . Pollut ., 8:1.
- Zilversmit , D. B. et al (1950) J. Lab . Clin . Med ., 35 :155 .

الفصل الثامن

الإضافات الغذائية

وتشتمل على كل ما يضاف للأغذية بغرض إثرائها غذائية ، أو تحسين رائحتها وطعمها وشكلها وقوامها ، أو لضرورتها في تسهيل التصنيع ، أو لوقايتها وحفظها ، وعلى ذلك تشمل الفيتامينات والأملاح المعدنية والأحماض الأمينية والأحماض الدهنية والهرمونات والمستحلبات وموانع الأكسدة والملونات ومكسبات الطعم والرائحة إضافة إلى العقاقير أو ما يضاف بغرض الغش .

١ - التوكوفيرولات ومضادات الأكسدة المختلفة :

(Ethoxyquin ، BHA ، BHT)

تستخلص العينات بمخلوط من الميثانول ودي إيثيل إيثير (٦٠/٤٠) ٣ مرات ، (١٠٠ ، ١٠٠ ، ٥٠ مل) ، وتجمع المستخلصات وترج مع ٢٠ مل ماء مرتين للغسيل ، وتبخر تحت تفريغ على حمام مائي . أذب المتبقي في ١٠ مل أسيتون ، بخر للجفاف وأذب المتبقي في مخلوط هكسان حلقي مع ثالث إيثيل أمين (١/٩) ، تبقع رقائق كروماتوجرافي (سليكاجيل منشطة لمدة ساعة على ١١٠°م) بهذا المستخلص ، مع تبقيع محاليل قياسية من التوكوفيرول وخلات التوكوفيرول ومضادات الأكسدة (٢٥ مجم / ١٠ مل مخلوط سيكلو هكسان مع تري إيثيل أمين ١/٩) . تطور الرقائق في تانكات بها مذيب ن - هكسان / إيثيل ميثيل كيتون / دي- ن- بيوتيل إيثير (٦/٧/٤٣). تزال الرقائق من التنك، وتجفف بتيار هوائي، وترش بدليل قياسي حديد وسيانيد بوتاسيوم (أذب ١,٣ جم كلوريد حديديك في ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ٢ مولر ثم ٠,٧ جم حديد وسيانيد بوتاسيوم في ١٠٠ مل ماء واخلط المحلولين بنسبة ١ : ١ قبل الاستخدام مباشرة ، ويؤخذ من ذلك حجمان + حجم من حمض هيدروكلوريك مركزا للاستعمال) ، وتسخن على ٤٠°م لمدة ١٥ دقيقة للتعرف على البقع ، ويرش رقيقة أخرى (عليها بقع العينات بعد تطويرها وتثبيتها) بدليل دي بيريديل (٠,٥ جم ٢-٢- دي بيريديل تذاب في ١٠٠ مل إيثانول ، ويذاب ٠,٢ جم كلوريد حديديك فى ١٠٠ مل إيثانول ، وقبل الاستعمال يخلط المحلولان بنسبة ١:١) فيظهر فيتامين هـ ومضادات الأكسدة كبقع حمراء بعد الرش ، كما يمكن فحصها تحت لمبة أشعة فوق بنفسجية على موجتي ٢٥٤، ٣٦٠ نانومتر . ويمكن استخلاص الفيتامين من الرقائق بالإيثانول وقياس كثافته الضوئية على ٢٩٢ نانومتر .

٢ ـ الفيورازوليدون Furazolidon :

رغم أن الفيورازوليدون يستعمل أحياناً للمقاومة أو دافعاً للنمو ، إلا أن بعض الدول تحرم قوانين أعلافها من استخدامه ، إلا أنه يستعمل في بديلات اللبن ومكملات الأعلاف، والتركيزات العالية التي تتحملها الخنازير لا تتحملها العجول بل تظهر حالات سمية حادة أو مزمنة عليها ؛ لذا فإنه من المهم التعرف على هذا المركب وتقديره . فقد تمكن من تقديره على الكروماتوجرافي بحد أدنى وصل إلى ٦٠-٩٠ مجم / كجم .

وفيما يلي طريقة لتقديره على الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط (HPLC) .

استخلاص العينة :

يؤخذ ٢٠ جرام عينة مطحونة في دورق معياري سعة ١٠٠ مل ، ويكمل للعلامة بالأسيتون ، ويجنس لمدة ٢ دقيقة في مجنس Homogeniser ثم في حمام موجات فوق صوتية Ultrasonic bath لمدة ساعتين ، ثم يترك ليلة بالثلاجة. رشح ثم بخر الراشح على حمام مائي تحت تفريغ على ٥٠ْم حتى الجفاف ، ثم يذاب الراسب في ٥ مل أسيتون (باستعمال الحمام فوق الصوتي) للتنقية على العمود الكروماتوجرافي .

التنقية :

على عمود طوله ٢٠ سم مليء بأوكسيد الألومنيوم (٣٠ جم / عمود) . بعد غسل أوكسيد الألومنيوم بالماء المقطر ١٠ مرات، وتجفيفه حتى ثبات الوزن على ١٠٥ْم، يعلق في أسيتون (بعد أن يبرد) باستعمال الحمام فوق الصوتي، ثم يعبأ في العمود (٢٠سم× ٢٠م) الزجاجي . يصب مستخلص العينة (٥ مل) على العمود ، ثم يغسل بمقدار ١٠٠ مل أسيتون ، ويبخر الغسول على حمام مائي تحت تفريغ على ٥٠ْم . وكخطوة أخرى للتنقية ينقل الراسب بكحول الإميل (بمقدار ٢ مل × ثلاث مرات) إلى أنبوبة طرد مركزي سعة ١٠ مل ، ويضاف إليه ٢ مل محلول يوريا (٤,٥ جم / ٥ مل ماء مقطراً) ، ويخض على هزاز أنابيب للاستحلاب ، ثم يطرد مركزيا على ٣٥٠٠ لفة / دقيقة . ينقل محلول اليوريا (السفلي) مباشرة إلى عمود HPLC .

ظروف الفصل على HPLC :

يستعمل مخلوط التطوير (غسيل) من الميثانول/ ماء مقطراً (٣٠/ ٧٠ حجم/حجم)، بسرعة سريان ١ مل / دقيقة ، وضغط حتى ١٦٠٠ جوي ، وحرارة العمود ٥٠م ، وطول موجة الامتصاص ٣٦٥ نانومتر ، وسرعة سير الكروماتوجرام ٥ م / دقيقة ، وجهد الرسام ٥ أو ٥٠ ملي فولت . العمود مليء بمادة Lichrosorb RP8 وهي Reverse Phase .

التعرف على الفيورازوليدون :

من خلال معرفة الزمن بالثانية الذي يظهر عنده أعلى ارتفاع (قمة) لمنحنى المركب

ومقارنته للزمن الذي تظهر عنده قمة منحنى المحلول القياسي يتم التعرف على المركب ، ولتقدير كميته تقارن ارتفاعات (أو مساحات) المنحنيات للعينات ضد المحاليل القياسية (خارجية أو داخلية) مع عمل حساب حجم المستخلص والتخفيف ، فيتم استنتاج تركيز المركب في مادة العلف بالجزء / مليون ppm (مجم / كجم) . وقد تم إعادة اكتشاف Recovered حوالي ٧٨٪ من الكمية المضافة للعلف كمحلول قياسي داخلي Internal Standard Method . وقد أجرى هذا التكنيك على العلف المصنع (المخلوط) وبديلات اللبن وبادئ عجول ومخلوط معادن للبقر . وتم اكتشاف حتى ٦٠ جزء / بليون ppb (ميكروجرام / كجم) كحد أدنى .

هذا ويمكن التعرف على هذا المركب نوعيا بالميكروسكوب ، إلا أن التحليل الكيماوي الطبيعي وإن صعب إلا أنه أدق . ويمكن استخدام رقائق كروماتوجرافي سليكاجيل لتفريد هذا المركب ، إلا أن المعاد اكتشافه في حدود ٤٠-٥٠٪ فقط ، ونحتاج لقياس المركب بعد ذلك سبكتروفوتومتريا لتقديره كميا .

٣ ـ مضادات الكوكسيديا Coccidiostats :

أ ـ الأمبروليوم Amprolium :

من أشهر مضادات الكوكسيديا ، ويتم تقديره باستخلاص العينات بالماء والميثانول (٢/١) بمقدار ١٠٠ مل. أضف إلى ١٠ مل من المستخلص ٠,٥ جم كلوريد صوديوم + ٣٠ مل محلولاً منظفاً (٠,٥ جم صوديوم دي أوكتيل سلفوسكسينات تذاب في ٣٠ مل إيثانول ٩٦٪ وخفف إلى لتر بالماء) واضبط PH المحلول إلى ٨ بقلوي . استخلص المحلول بالداي كلوروإيثان (١٠ مل ثم ٤ مرات × ٢٠ مل) ، واجمع المستخلصات ، ورشحها على صوف زجاجي يحتوي عدة بلورات من كبريتات الصوديوم اللامائية ، وبخر على ٤٠م إلى ٥ مل . طور المستخلص على عمود كروماتوجرافي حامضي ضعيف (٤-٥ جم أكسيد ألومنيوم) ، واغسل بالدي كلوروميثان ، واسحب الأمبروليوم بغسيل العمود بالميثانول (١٥ مل) ، وبخر الغسول إلى الجفاف . أذب المتبقيات في ١٠ مل ميثانول . خذ ٥ مل من المستخلص + ١٠ مل دليلاً ملوناً (من إذابة ٢-٧- نافثالين ديول ، سيانيد بوتاسيوم ، حديدي سيانيد بوتاسيوم في وسط قلوي : ٢٥ مل ٢-٧- نافثالين ديول في لتر ميثانول ، ٢٥٠ مجم سيانيد بوتاسيوم في ٢٥ مل ماء ، ٥٠ مجم حديدي سيانيد بوتاسيوم في ٢٥ مل ماء ، وتخلط المحاليل بنسب ٥/٥/٩٠ ، وتترك نصف ساعة ، ثم يضاف إليها ١٠٠ مل من هيدروكسيد صوديوم (١١,٢ جم / لتر ماء)) . يترك المخلوط يستقر ٢٠ دقيقة ويقاس الامتصاص على ٥٣٠ نانومتر ضد مقارنة . يقدر امتصاص المحلول القياسي (٠,١٢٥ - ٠,٩٣٧ مجم / ٥ مل) بإذابة ٢٥ مجم أمبروليوم في ٢٠٠ مل ميثانول في ماء (٢/١) .

ب ــ بوشينولات Buchinolate :

تستخلص العينات بالكلوروفورم (١٠٠ مل) بالتقليب المستمر ثم الترشيح ، ويبخر ٨٠ مل من المستخلص ، وتذاب المتبقيات في حجم صغير من الكلوروفورم ، ثم يخفف إلى ١٠ مل في دورق معياري . يعد محلول قياسي بإذابة ٥٠ مجم مادة نقية في ١٠٠ مل كلوروفورم ، والتخفيف إلى تركيز ١٠٠ ميكروجرام / مل . تبقع مستخلصات العينات والمحلول القياسي على رقائق كروماتوجرافي من السليكاچيل سبق تنشيطها على ١١٠°م لمدة ساعتين . تطور الرقائق في كلوروفورم لفصل الشوائب ، ثم تجفف الرقائق ، وتطور ثانية في مخلوط كلوروفورم / إيثانول (١/١٠) ، وتفحص تحت أشعة فوق بنفسجية ، فتظهر البوشينولات كبقعة عند Rf ٠,٤–٠٠,٦ تقشط بقع العينات والمحلول القياسي ، وتستخلص في ١٠ مل إيثانول ٨٠٪ ، وتقاس الكثافة الفلورسنتية لهما على ٣٧٥ نانومتر ، بعد الإثارة على موجة طولها ٢٦٥ نانومتر باستخدام جهاز فلوروسبكترو فوتومتر .

جـ ــ ميتيكلور بندول (كلوبيدول Clopidol) Metichloropindol :

زن عينة (٣٠–٥٠ جم) ، واستخلصها بميثانول أمونيومي (٩٥/٥) ٤٠٠ مل لمدة ٢٠ دقيقة . وطور المستخلص على عمودين ، الأسفل به مبادل أنيوني ، والأعلى به أكسيد ألمونيوم قاعدي (٢٥ جم منشطاً على ١٠٥°م) دون فاصل بينهما . فيوضع ١٠ مل مستخلص عينة على العمود القلوي تغسل على العمود بالميثانول ٨٠٪ (١٢ مل) ، ويترك الغسول يتساقط على العمود السفلي . أزل العمود العلوي واغسل العمود السفلي بحمض خليك ٤٠٪ (٤ مل) ، واجمع الغسول في دورق معياري ٢٥ مل ، وخفف إلى العلامة. وقدر الكثافة الضوئية على مدى من أطوال الموجات ٢٩٥–٣٥٠ نانومتر ، وتطرح القيمة عند ٢٦٧ نانومتر من الخط الأساسي المقدر بتوصيل النقطتين عند ٣٢٧ ، ٢٩٧ نانومتر . يحسب التركيز بالمقارنة بمحلول قياسي (١٢٥ مجم كلوبيدول نقي في ٢٥ مل ٢٪ صودا كاوية ، وخفف إلى ٥٠٠ مل بالماء) مقدراً في ٤٠٪ حمض خليك ، ويعبر عن التركيز كجزء / مليون .

د ــ روبندين (روبنزيدين Robenzidene) Robenidine :

زن ٢٠ جم عينة ، واستخلصها بأسيتون محمض ١٠٠ مل (٨,٣ مل حمض هيدروكلوريك مركز / لتر أسيتون) . رشح المستخلص ، ينقل منه ١١ مل على عمود من ١٠ جم أكسيد ألمونيوم ، ويغسل بالأسيتونيتريل (١٠٠ مل ٢– ميثوكسي إيثانول / لتر أسيتونيتريل) ثم احصل على مضاد الكوكسيديا بتطوير العمود بمقدار ٢٠ مل أسيتونيتريل أمونيومي (٤٠ مل أمونيا مركزة / لتر محلول) ، واجمع الغسول الأخير في دورق معياري ٥٠ مل ، وأضف إليه ١ مل بوتاسا كاوية كحولية (٣٪) ، وقدر الكثافة الضوئية على

موجتي ٤٤٠ ، ٥٥٠ نانومتر ثم أضف ٠,٥ مل حمض ثلاثي كلوروخليك (٢ جم / ٤ مل محلول) ، واخلط وأعد تقدير الكثافة الضوئية على نفس الموجتين .قدر بنفس الأسلوب الكثافة الضوئية في الوسط القلوي والحامضى لمحلول قياسي (٠,١ جم روبنزيدين/ ٢٥٠ مل ميثانول) ، وقدر الفرق للامتصاص (A) بين الوسط الحامضي عند الموجتين (A_{440} - A_{550}) والوسط القاعدي عند نفس الموجتين (B_{440} - B_{550}) حيث

$$A = B_{440} - B_{550} - (A_{440} - A_{550})$$

وذلك للعينات وللمحلول القياسي لحساب تركيز مضاد الكوكسيديا في العينة .

وفي طريقة مطورة وأبسط من السابقة ، تستخلص ٢٥ جم عينة بمقدار ٢٠٠ مل أسيتون محمض ، ثم ينقل منها ١,٦ مل إلى دورق معياري ٥ مل ويخفف ، تبقع رقائق كروماتوجرافي سيليكاجيل بالعينات والمحلول القياسي (١٠ ميكروجرام / مل) ، وتطور الرقائق في مخلوط كلوروفورم / ميثانول (٥/٩٥) ، ثم تجفف فيظهر الروبنزيدين تحت الأشعة فوق البنفسجية (٢٦٥ نانومتر) عند Rf ٠,٧٥ ، تقشط بقع الروبنزيدين ، وتنقل إلى أنبوبة اختبار وتستخلص بمقدار ٢٠ مل دي ميثيل فورماميد ، وترشح إلى دورق مخروطي ٢٥ مل ، ويضاف إليها ٠,١ مل صودا كاوية ١ مولر ، وبعد ١٥ دقيقة تقدر الكثافة للون الأصفر على ٤٦٤ نانومتر ضد مقارنة من نفس محاليل المحتوية ٠,١ مل صودا كاوية ١ مولر لكل ٢٠ مل دي ميثيل فورماميد .

هـ ـ نيكاربازين Nicarbazine :

يشترط في تقديره حجب جميع المحاليل عن الضوء المباشر .

اغل ١٠ جم عينة مع ١٠٠ مل دي ميثيل فورماميد ، ثم برد واطرد مركزياً . طور على عمود كروماتوجرافي من ١٠ جم أكسيد ألمونيوم متعادلاً ، بوضع ٢٥ مل من المستخلص على العمود ، وغسيله ٣ مرات × ١٠ مل دي ميثيل فورماميد ، ثم الحصول على مضاد الكوكسيديا بغسيل العمود ٩ مرات × ٥ مل إيثانول . استبعد أول ١٥ مل ثم اجمع ٢٥ مل التالية في دورق معياري ، وخفف إلى العلامة . تجرى نفس الخطوات على ٢٥ مل محلولاً قياسياً .

وللتقدير ينقل ٢٥ مل من المستخلص في دورقين معياريين ٥٠ مل ويضاف للأول ٥ مل صودا كاوية كحولية (بتخفيف ٢ مل ٥٠٪ هيدروكسيد صوديوم إلى ١٠٠ مل بالإيثانول) ويملأ الدورقان بالإيثانول إلى العلامة . ويتم القياس ضد إيثانول على ٣٤٤ نانومتر مع إجراء تقدير لمحلول قياسي ٢٥ مجم مادة نقية تذاب في ١٥٠ مل دي ميثيل فورماميد بالتسخين والتخفيف إلى ٥٠٠ مل .

و ــ زوالين Zoalene :

يستخلص ۱ جم عينة بالداي ميثيل فورماميد (۲۰۰ مل) الساخن لمدة ٥ دقائق. ينقل المستخلص إلى دورق معياري لتر ، وخفف إلى العلامة . خفف المستخلص ۱۰ أضعاف ، وانقل ۱۰ مل إلى دورق معياري ۲٥ مل ، وخفف إلى العلامة بمحلول ٤٠٪ ۱-۳-بروبان دي أمين ، وبعد ۳ دقائق من الخلط قس الامتصاص على ٥٦٠ نانومتر ، وقدر كذلك الامتصاص لمحلول قياسي (۲٥۰ مجم مادة نقية في لتر دي ميثيل فورماميد وخفف ۱۰ أضعاف) بنقل ۱۰ مل محلولاً قياسيا في دورق معياري ۲٥ مل وعاملها كما سبق مع العينة .

ز ــ مونensين (رومنسين Rumencin) Monensin :

مضاد للكوكسيديا حديث الاكتشاف (١٩٦٧) عزل من بيئة Streptomyces cinamo-nennsis ، ويتم تقديره بوزن ۲۰ جم عينة ، وأضف إليها ۲٥ مل ماء + ۲٥۰ مل كلوروفورم ، واستخلص بالخلط الجيد ، ثم انقل الطبقة المائية ، وأضف إليها ۲۰۰ مل ميثانول ، واخلط ثم رشح ، وجفف بالتبخير تحت تفريغ ، وأذب المتبقيات في أقل كمية ميثانول . بقع رقائق كروماتوجرافي بمستخلص العينة وبمحلول قياسي (۱۰۰ ميكروجرام رومنسين نقى في ميثانول) ، ثم طور الرقائق في دي إيثيل إيثير ، ثم جففها وطورها ثانية في كلوروفورم / أسيتون / بروبانول (٥/١٠/٨٥) ، ثم جفف الرقائق ورشها للإظهار بمحلول ٥٪ ڤانيللين Vanillin في ميثانول (١٠٪) ، ثم رش ثانية بحمض كبريتيك ميثانولي ۱۰٪ ، وسخن الرقائق بتيار هواء ساخن ، فيظهر الرومنسين بلون أحمر لامع ثم أخيراً بلون بني ، وإذا باتت الرقائق ليلة تختفي الأشرطة الحمراء ويستبقى شريط الرومنسين على الرقائق ، فيمكن قشط مناطقه واستخلاصها بالميثانول وقراءة كثافتها الضوئية على طول موجة مناسب .

وينصح بالرجوع إلى المراجع التالية لمزيد من التفاصيل :

- AOAC (1980) Association of Official Agricultural Chemists 13 th Ed .Washington .
- Hazato , t . et al . (1979) Anal Biochem ., 94 : 29
- Knobloch , E & Cerna - Heyrovska, J . (1979) Fodder Biofactors .
- Schwedt , G. (1978) Anad Biochem ., 24 : 29 .

Their Metheds of Determina tion Academia , Praha .
- Schweighardt , H. & Leibetseder , J . (1979) Wien tierarztl . Mschr., 66 : 325 .

الفصل التاسع

المواد الضارة والسامة

فى مواد العلف وغيرها

قد تحتوي الأغذية المختلفة على مصادر للمواد الضارة والسامة بشكل أو بآخر ، فقد تكون هذه المواد ضمن التركيب الطبيعي للغذاء أو قد تنشأ من خلط الغذاء بمواد ضارة ، إما عن عمد كغش أو للوقاية والعلاج أو الحفظ ، أو بدون عمد كخطأ في التصنيع أو لتلوث أيا كان مصدره . فهناك نباتات تنتمي لعائلات نباتية معروف عنها أنها سامة ، أو قد تحدث إصابة بفطريات أو بيكتريا (وسمومهما) أو أن تتلوث الأغذية بشوائب معدنية أو بمبيدات مختلفة ، أو قد تتركز فيها الإضافات المختلفة نتيجة زيادة الجرعة أو عدم تجانس خلطها أو نتيجة سوء التخزين والتلف . وتصل هذه المواد الضارة إلى الإنسان مباشرة (في الغذاء والماء) أو بطريق غير مباشر (عن طريق متخلفاتها في أنسجة الحيوانات التي تناولتها في غذائها وماء شربها) ، فهي بالتالي تؤثر على الحيوان والإنسان .

لذلك اهتمت كثير من الدول المتقدمة في وضع قوانين لمواد العلف المتداولة في كل منها ، وتضمنت هذه القوانين كذلك الحدود القصوى المسموح بتواجدها في مواد العلف المنفردة المختلفة بالمليجرام / كجم مادة جافة (٨٨٪ مادة جافة) كالتالي :

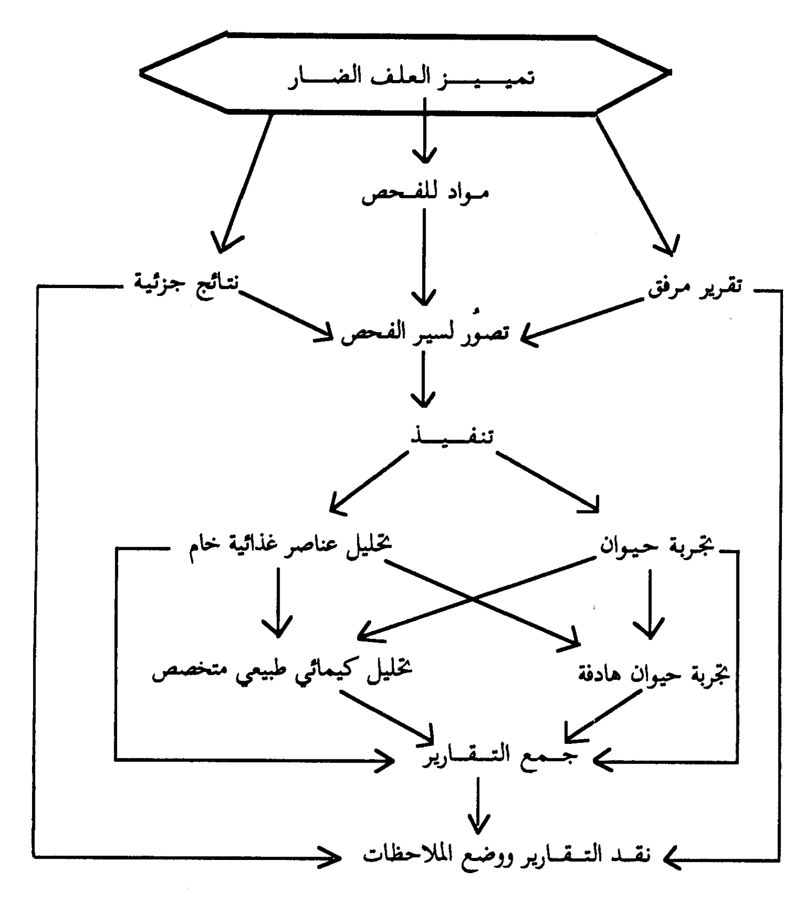
المادة السامة	أقصى حد سماح لتواجدها (جزء / مليون)
أفلاتوكسين ب١	٠,٠١ ـ ٠,٠٥
إرجوت	١٠٠٠
جوسيبول حر	٢٠ ـ ٥٠٠
بذور حشائش	٣٠٠٠
زيت خردل	١٥٠ ـ ١٠٠٠
قشور خروع	١٠
زرنيخ	٢
رصاص	٥ـ١٠

المادة السامة	أقصى حد سماح لتواجدها (جزء / مليون)
فلور	٥٠ ـ ٣٥٠
زئبق	٠,١
نيتريت صوديوم	١٥
حمض هيدروسيانيك	١٠ ـ ٥٠
كلوردان	٠,٠٥
DDT, DDE, DDD	٠,٠٥ ـ ٠,٣٠
الدرين ، دى الدرين	٠,٠٢ ـ ٠,٠٥
أندرين	٠,٠٢
هبتا كلور ، هبتا كلوربوكسيد	٠,٠٣ ـ ٠,٠٥
هكسا كلور بنزول	٠,٠٢٥ ـ ٠,٠٦٠
ثيو برومين	٣٠٠ ـ ٧٠٠
فنيل ثيوأوكسازوليدون	٥٠٠ ـ ١٠٠٠

الحدود الصغري تكون للحيوانات الحساسة وصغيرة السن والحلابة والضعيفة ، بينما الحدول العظمى لباقي الحيوانات .

فالعلف التالف لا يصلح كمادة علف ، وليس من السهل الحكم بتلف مادة علف بفحص عينة واحدة ، سواء من حيث تركيبها أو مظهرها ولونها وخلافه ، بل يلزم زيارة واحدة لموقع المزرعة وملاحظة مواد العلف على طبيعتها في مخازنها ونوع أرضية المخزن ، وإذا ما كانت رطبة أو مخزناً عليها الأعلاف مباشرة بلا أرضيات خشبية ، أو إن وجدت الأعلاف مكتلة ، فأخذ عينة من هذه المواقع قد توضح الإصابة بالقراد وتشخص الإصابة الراجعة لمادة العلف التالفة الضارة . ظهور السوس Mites علامة لبداية تلف مادة العلف؛ إذ إن الإصابة بالسوس مرتبطة بارتفاع محتوى الماء بمواد العلف المخزنة ، والتي تعد كذلك شروطاً ملائمة لبقاء البكتريا أو الفطر . وقد يلجأ لتحليل الأمونيا الحرة (التي لا يجب أن ترتفع عن ٠,٢٥٪) لتقدير درجة فساد مادة علف .

ولتشخيص العلف الضار يلزم الإحاطة بما يمكن معرفته وذلك كالتالي :



وعليه ، فإنه تلتقي وترتبط التحاليل الكيماوية وتجارب الحيوان الهادفة في منتصف الطريق لتشخيص العلف الضار . فتجربة الحيوان تعطي فكرة عن أسباب الضرر وشدته ، أما تجربة الحيوان الهادفة فهي لملاحظة الأضرار التي قد لا تظهر في الواقع العملي ، وهنا قد لا تتشابه دائماً أعراض الضرر في التجربة بما هو في الطبيعة .

ويفيد التقرير المرفق بالعينة في كل من وضع خطة فحص العينة ، وكذا في الحكم الأخير على النتائج ، فيكون الفحص موضوعيا ومنطقيا وأسهل في الإجراء ، وتمنع من وقوع المحكمين أو المحللين في خطأ الحكم . ويشمل التقرير أعراض المرض بالضبط ، وحجم نقص الإنتاج ، وتصوراً لسير الضرر ، وعليه يتوقف نجاح أو عدم نجاح وسائل

العلاج والنتائج الأولية . وعلى أساس ما يثبت من أسباب الضرر أو إثبات صلاحية العلف للتغذية ، يتوقف ذلك على أسلوب أخذ العينة ، خاصة لو كان الحكم على العلف متعلقاً بالقضاء ، فيلزم أخذ العينة بواسطة خبير عدل ، أو إذا لم يتوفر فتؤخذ في حضور شهود (زراعي ، بيطري ، مورد) وهنا تؤخذ كمية كبيرة (٥٠-١٠٠ كيلو) في عبوات أصلية للتحليل في جهات محايدة . ومع التقرير تذكر بيانات عن الشركة المنتجة ، وتركيب العلف ، ونوع العليقة ، وكذلك وصف المشروع من حيث نوع وعدد الحيوانات ، ونوع التسكين للحيوانات وكثافة الحيوانات ونظام الشرب والأكل ، وحكم على النواحي الصحية والإدارية . ويجب معرفة أن الحكم على صلاحية علف اليوم من الصعوبة بمكان ، إذ إن إمكانيته محدودة وتنجح في حالة توفر حاسة بوليسية .

ويتطلب الأمر أحياناً إجراء فحص خارجي قبل التحليل للعينة ، وذلك حيث تؤدي الحشرات والقوارض إلى مهاجمة المحاصيل المختلفة في الحقل والمخزن ، وتؤدي إلى تلوثات . وفحص مواد العلف للحشرات وأجزائها يتطلب معرفة وتدريباً وخبرة في مجال الحشرات ، للتعرف عليها بالفحص البصري أو المجهري .

أما التلوث بالرمل والتربة والزجاج فيتم فحصه بالفصل في سائل كثافته تقارب ١,٤٩ ، ففيه تستقر الأجزاء الثقيلة بينما تطفو الأنسجة النباتية ، فيفصل الأجزاء المترسبة ، وتفحص بالغربلة بمناخل .

وفيما يلي وصف للتعرف على بعض السموم ومنها :

١ - الجلوكوزيدات السيانيدية Cyanogenetic Glycosides :

توجد في كثير من مواد العلف ، ويجرى لها اختبار نوعي Qualitative Test ، فيعد ورق بيكرات بغمس شرائط من ورق الترشيح ٦×٢ سم في محلول ١ ٪ من حامض البيكريك ، ثم تجفف هوائيا ثم تغمس ثلثها في محلول ١٠ ٪ كربونات صوديوم ، ثم تجفف ، ويحفظ هذا الورق في برطمان مغلق . قطع ٢٥ جم من أجزاء المادة النباتية لأجزاء صغيرة واطحنها جيداً وضعها في دورق مخروطي سعة ١٥٠ مل مع ٦٠ مل ماء مقطراً وسده بسدادة بها قطعة من ورق بيكرات صوديوم مبللة ، واحترس ألا تلمس هذه الورقة أي جزء من العينة النباتية . أضف بضع نقط كلوروفورم وسد وحضن على ٣٧°م . يتحول لون الورقة تدريجيا إلى البرتقالي ، ثم إلى الأحمر الطوبي وذلك إذا كانت المادة النباتية تحتوي على الجلوكوزيدات السيانيدية . هذا الاختبار حساس ، وتعتمد سرعة تغيير اللون فيه على وجود كمية من حمض الهيدروسيانيك HCN الحر . ويعتمد هذا الاختبار على المواد النباتية الطازجة ، فيعطي نتائج ممتازة إلا أنه يعطي نتائج نسبية مع المواد الجافة ، وإذا استخدمت البذور فلابد من طحنها وبللها بالماء ، ثم تحلل مائيا في أنبوبة اختبار مغلقة محتوية على

ورق بيكرات الصوديوم . وقد يضطر لإضافة كمية ضئيلة من مادة مستحلبة Emulsion . اختبر التفاعل بعد ، ١ ، ٢ ، ٤ ساعات . ويكون الاختبار موجباً بعد ٥ ساعات تفاعل إذا احتوى العلف على ١ مجم سيانيد / ١٠٠ مجم علف. الجرعة السامة ٢ مجم / كجم وزن حي من البقر .

٢ ـ حمض الهيدروسيانيك Hydrocyanic Acid :

يتكون بتحليل الجلوكوزيدات في البقول وبذور الكتان ومسحوق التابيوك ، ويقدر بطريقتين :

أ ـ المعايرة بالحامض ، أو :

ب ـ المعايرة بالقلوي .

أ ـ طريقة المعايرة بالحامض :

وفيها ينقع ١٠-٢٠ جم عينة مطحونة (لتمر من منخل نمرة ٢٠) في دورق كلداهل (٨٠٠ مل) مع ١٠٠ مل ماء على درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ، ثم يضاف ١٠٠ مل ماء ، وتقطر ويجمع البخار في ٢٠ مل نترات فضة $AgNO_3$ ٠,٠٢ عياري محمضة بواسطة ١ مل من حمض النيتريك HNO_3 . قبل التقطير يضبط الجهاز ، بحيث يكون طرف المكثف أسفل سطح السائل في القابلة . عند تجميع ١٥٠ مل يرشح المتقطر خلال قمع جوتش Gooch، وتغسل القابلة والقمع بقليل من الماء ، ثم يعاير فائض نترات الفضة في المتقطر والغسيل بواسطة محلول سيانيد بوتاسيوم KCN تركيز ٠,٠٢ عياري باستخدام دليل شب الحديد ، واستنتج تركيز حمض الهيدروسيانيك كالتالي :

1ml 0.02 N Ag NO_3 = 0.54 mg HCN

ب ـ طريقة المعايرة بالقلوى :

وفيها يوضع ١٠-٢٠ جم عينة (مطحونة لتمر من منخل رقم ٢٠) في دورق كلداهل سعة ٨٠٠ مل، أضف ٢٠٠ مل ماء ، واتركه ساكناً ٢-٤ ساعات ، قطر واجمع ١٥٠-١٦٠ مل متقطراً في محلول صودا كاوية NaOH (٠,٥ جم / ٢٠ مل مـاء)، وخفف الحجم حتى حجم معلوم وليكن ٢٥٠مل ، خذ منه ١٠٠مل ليضاف إليها ٨ مل هيدروكسيد أمونيوم ٦ عياريا + ٢مل يوديد بوتاسيوم ٥٪، وعاير بواسطة نترات الفضة تركيز ٠,٠٢ عياريا ، نقطة الانتهاء خافتة لكن تظل عكارة يسهل التعرف عليها خاصة في وجود خلفية سوداء .

استنتج تركيز حمض الهيدروسيانيك حيث إن :

1ml 0.02 N Ag NO_3 = 1.08 mg HCN

في وجود حمض الهيدروسيانيك بشدة تكون التغذية جافة فقط أو بعد الطبخ .

كما يمكن تقدير حامض الهيدروسيانيك كالتالي :

١ ـ يوضع ٢٥٠ مل ماء مقطراً في دورق مخروطي سعة لتر ، ويسخن على درجة حرارة ٣٨°م .

٢ ـ يوزن ٢٥-٥٠ جم مادة علف وتضاف إلى الماء .

٣ ـ يحضن الدورق بمحتوياته على ٣٨°م لمدة ١٢ ساعة .

٤ ـ يضاف ٥٠ مل محلول بيكربونات صوديوم مشبعة وتقطر المحتويات بالبخار لمدة ٠,٥ ساعة .

٥ ـ تعاير المتقطر بمحلول اليود (٠,٠١ عياري) في وجود دليل النشا .

٦ ـ كل ١ مل (٠,٠١ عياريا) يود ≡ ٠,٠٠٠٢٧ جم حامض هيدروسيانيك فمن حساب حجم محلول اليود الذي عادل حامض الهيدروسيانيك يمكن حساب تركيزه في العينة .

٣ ـ التانينات Tanins :

توجد التانينات في حبوب السورجم، وكثير من البقوليات ، وأوراق الأشجار والشجيرات، وتؤدي هذه التانينات إلى خفض معاملات هضم هذه الأعلاف .

ويقدر التانين كنسبة مئوية في العينة كما يلي :

١ ـ يؤخذ ١ جم عينة مطحونة في دورق ١٢٥ مل مع ٥٠ مل ميثانول .

٢ ـ سد الدورق واخلط جيداً بالتقليب ثم اتركه .

٣ ـ بعد ٢٠-٢٨ ساعة قلب ثانية واتركه يستقر .

٤ ـ اسحب بماصة ١ مل من الرائق إلى أنبوبة مع ٥ مل دليل ڤانيلين (حجم من حمض هيدروكلوريك ٨٪ في ميثانول مع حجم من الڤانيلين ٤٪ في ميثانول (محضر يومياً) تخلط قبل الاستعمال مباشرة) .

٥ ـ اقرأ الكثافة الضوئية على ٥٠٠ نانومتر بعد ٢٠ دقيقة ضد محلول مقارنة من دليل الڤانيلين .

٦ ـ يعمل تقدير لمحلول قياسي من ٥٠ مجم كاتيشين Catechin في ٥٠ مل ميثانول (بأن يجرى عليه كما في خطوتي ٤ ، ٥) ، فالكثافة الضوئية لهذا المحلول تعادل الكثافة الضوئية لمستخلص العينة المحتوية على ٥٪ تانين في ١ جم عينة .

وإذا أريد تقدير الفينولات الكلية والتانين فيمكن ذلك بإجراء التالي :

١ ـ توزن عينة مطحونة (٥ جم) وتستخلص في الماء (٤٠٠ مل) لمدة ٠,٥ ساعة ، ثم تبرد وتنقل إلى دورق معياري ٥٠٠ مل ، وأكمل إلى العلامة ، وهز جيداً ثم رشح .

٢ ـ اسحب ١٠ $\frac{1}{2}$ مل من الراشح + ٥ مل دليلاً Folin Ciocalteu Phenol Reagent (١٠ جم تنجستات صوديوم + ٢,٥ جم موليبدات صوديوم + ٧٠ مل ماء في دورق ١٠٠ مل + ٥ مل حمض فوسفوريك + ١٠ مل حمض هيدروكلوريك ، واغل تحت مكثف عاكس ١٠ دقائق ثم أضف ١٥ جم كبريتات ليثيوم + ٥ مل ماء ونقط من البرومين ثم اغل ١٥ دقيقة بدون مكثف . برد وأكمل إلى ١٠٠ مل ثم رشح) + ١٠ مل محلول كربونات صوديوم (١٠٠ مل ماء + ٣٥ جم كربونات صوديوم لامائية تذاب على ٧٠-٨٠ْم ، برد ليلة واسحب الرائق للاستعمال) وأكمل في دورق معياري إلى ١٠٠ مل ، واخلط وقس الكثافة الضوئية بعد ٣٠ دقيقة على ٧٦٠ نانومتر ضد مقارنة من نفس المحاليل دون عينة .

٣ ـ خذ ١٠ مل من محلول قياسي (١٠٠ مجم حمض تانيك في لتر ماء يحضر طازجاً لكل تقدير،كل ١ مل ≡ ٠,١ مجم تانيك) وأجر عليه كما في خطوة رقم (٢).

٤ ـ احسب الفينولات الكلية كحمض تانيك ٪ =

$$\frac{\text{مجم حمض تانيك (من المحلول القياسي)} \times \text{التخفيف} \times \text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٤٠٠٠}{\text{وزن العينة (جم)} \times \text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times ١٠٠٠}$$

٥ ـ جزء آخر من المستخلص للعينة يضاف إليه جزء من مسحوق جلد حيوان ، ثم يرشح ويعامل الراشح بالدليل كما سبق في خطوة رقم (٢) ، وتقدر الكثافة الضوئية لتقدير الفينولات غير التانينية غير المرتبطة ، وبطرحها من الفينولات الكلية من خطوة رقم (٤) تنتج الفينولات التانينية .

٤- الجوسيبول Gossypol :

مركب فينولي سام محدود الانتشار ، إذ يرتبط انتشاره بجنس القطن Gossypium ، وهو صبغة صفراء ، تتحول بالتسخين إلى ثلاث صبغات ، وهي :

- Gossypurpurin وهي صبغة قرمزية .
- Gossyfulvin وهي صبغة برتقالية .
- Gossycaeruculin وهي صبغة زرقاء .

ويتم تقدير الجوسيبول بوزن ١٠ جم عينة مطحونة جيداً ، وتحمض بواسطة حمض هيدروكلوريك تركيز ٢ عياريا حتى PH ٢-٤ ، وترج جيداً مع ١٠٠ مل إيثير ، واسكبه ثم حول الوسط للعينة لقلوي باستخدام الصودا الكاوية حتى PH ٩ ، ورج جيداً مع ١٠٠ مل أخرى من الإيثير. خذ المحلول في قابلة مغلفة بورق الألومنيوم Foil وبخره (بدون تسخين)

تحت جو من النتروجين حتى يتركز إلى ١ مل . بقع من هذا المستخلص على رقائق الكروماتوجرافي TLC وحمضه في الظلام في مخلوط مذيب مكون من ٩٠ : ١٠ : ٤ من كل من بنزين ٩٥ ٪ ، بيوتين ٤ ٪ ، حمض خليك ١ ٪ على الترتيب .

وتحتوي بذور القطن على ٠,٤ - ١,٧ ٪ جوسيبول .وكل صور المركبات التي يدخل في تركيبها الجوسيبول تنشأ أثناء التسخين . وأثر هذه المركبات في الإنسان غير معروف . ويؤدي التسمم بالجوسيبول إلى نقص معدل النمو ، وقلة الاستفادة الغذائية ، وأوديما بالرئة والكبد والكلى والطحال . المجترات تبدى مناعة ضد الجوسيبول لفعل الكائنات الحية بالكرش ، بينما العجول تتأثر بالجوسيبول لعدم اكتمال انتشار الكائنات الدقيقة بكرشها .

ولا ينبغي أن يتعدى الحد الأقصى للجوسيبول في مخلفات استخلاص الزيت من بذور القطن (نواتج الاستخلاص) عن ٠,٠١ ٪ .

وقد يفيد إضافة كبريتات الحديد للعلائق المحتوية على جوسيبول ، وذلك لمنع تأثير الجوسيبول على رداءة تلوين صفار البيض (التحول للون الزيتوني) .

ويقدر الجوسيبول الحر والكلى بطريقة ضوئية على طول موجة ٤٤٠ نانومتر بدقة تصل إلى ٢٠ مجم / كجم على أن تكون الخطوات على درجة حرارة ٢٠°م ، وأن يكون حجم العينة (تتوقف وزنتها على محتواها من الجوسيبول) بالضبط حوالي ٠,٥ - ٥ جم حسب نوع الجوسيبول المراد تقديره .

تقدير الجوسيبول الحر :

١ - ضع العينة الموزونة بالضبط في دورق ٢٥٠ مل مع ٥٠ مل مذيب أ (٥٠٠ مل مخلوط بروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) + ٢ مل ٣-أمينو بروبانول + ٨ مل حمض خليك ثلجي + ٥٠ مل ماء وأكمل إلى لتر بمخلوط بروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) . هذا المذيب يظل صالحاً للاستعمال لمدة أسبوع) وسد الدورق ، ورجه ساعة على محرك ميكانيكي .

٢ - رشح واجمع الراشح في دورق صغير مع تغطية القمع بزجاجة ساعة أثناء الترشيح . انقل من الراشح حجماً معلوماً إلى دورق مدرج ٢٥ مل + ٢ مل أنيلين وسخن ٣٠ دقيقة على حمام بخار لإحداث اللون .

٣ - برد إلى حرارة الغرفة ، وأكمل إلى العلامة بمخلوط البروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) ، واخلط واتركه يستقر ساعة ثم قس الامتصاص على ٤٤٠ نانومتر ، ضد مقارنة ، أجر عليها نفس الخطوات بدون عينة .

تقدير الجوسيبول الكلى :

١ - تنقل العينة إلى دورق مدرج ٥٠ مل مع ١٠ مل مذيب ب (٢ مل ٣-أمينوبروبانول + ١٠ مل حمض خليك ثلجي . برد إلى حرارة الغرفة ، ثم أكمل إلى ١٠٠

مل بالدي ميثيل فورماميد . هذا المذيب ثابت لمدة أسبوع) . سخن لمدة ٣٠ دقيقة على حمام بخار . برد إلى حرارة الغرفة ، وأكمل إلى العلامة بمخلوط البروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) . اتركه يستقر ١٠-١٥ دقيقة .

٢ ـ رشح وانقل ٢ مل من الراشح إلى دورق مدرج ٢٥ مل + ٢ مل أنيلين وسخن ٣٠ دقيقة على حمام بخار لإحداث اللون .

٣ ـ برد إلى حرارة الغرفة ، وأكمل إلى حجم ٢٥ مل بمخلوط البروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) ، واتركه يستقر ساعة بعدها يقدر الامتصاص .

يلاحظ عمل تجارب خاوية (دون عينة) بنفس الخطوات لكل من الجوسيبول الحر والجوسيبول الكلى ، وعمل منحنى قياسي لكل من الجوسيبول الحر (٢٧,٩ مجم خلات جوسيبول تذاب في مذيب أ ، وتكمل به إلى ٢٥٠ مل ينقل منه ٥٠ مل وتكمل إلى ٢٥٠ بنفس المذيب (١ مل ≡ ٠,٠٢ مجم جوسيبول) تترك ساعة على حرارة الغرفة قبل استخدامه) والجوسيبول الكلى (٢٧,٩ مجم خلات جوسيبول تذاب في مذيب ب وتكمل به إلى ٥٠ مل تركيز الجوسيبول في هذا المحلول ٠,٥ مجم / مل) مع ملاحظة أن محاليل الجوسيبول تظل ثابتة يوماً واحداً إذا حفظت من الضوء ، بإضافة الأنيلين إلى تركيزات مختلفة من كل محلول قياسي والتسخين فالتبريد فالتخفيف لنفس الحجم كما في العينات ، ثم تركها ساعة فالقياس كما ذكر مع العينة ، علماً بأن الامتصاص النوعي للجوسيبول الحر = ٦٢٥ وللجوسيبول الكلى هو ٦٠٠ فيمكن حساب تركيز الجوسيبول إما من المنحنى القياسي أو بمعلومية الامتصاص النوعي حيث إن :

$$\text{٪ جوسيبول} = \frac{\text{الامتصاص المقدر} \times ١٢٥٠}{\text{الامتصاص النوعي} \times \text{وزن العينة جم} \times \text{حجم المستخلص من الراشح مل}}$$

٥ ـ القلويدات :

١ ـ تستخلص القلويدات بالميثانول من العينة المطحونة جيداً ، والمجففة Freeze dried ، وتبقع على رقائق سليكاچيل كروماتوجرافي بدون دليل فلورسنتي .

٢ ـ تبقع كذلك رقائق الكروماتوجرافي بقلويدات نقية (محاليل قياسية) .

٣ ـ تطور رقائق الكروماتوجرافي في خليط من البنزين / دي كلورميثان / دي إيثيل إيثير / دي إيثيل أمين (٢/٥/٥/٥) .

٤ ـ تجفف الرقائق على ١٣٠°م لمدة ١٧ ساعة .

٥ ـ تفحص تحت ضوء فوق بنفسجي على طول موجة ٣٦٠ نانومتر ، فتظهر القلويدات بفلورسنت أزرق يظل لمدة عدة أسابيع ثابتاً . وقد يكون التسخين لمدة ٣٥ ساعة

أو أكثر أفضل لظهور فلورسنت أوضح .

٦ ـ تقارن معدلات سريان Rate of Flow (RF) العينات مع تلك للمحاليل القياسية ، ثم تفحص الرقائق على جهاز قياس الكثافة الضوئية للبقع الفلورسنتية لرسم منحنيات تمثل تركيزات هذه القلويدات . وقد تستخلص البقع الفلورسنتية وتقاس كثافتها الضوئية على ٤٠٠ نانومتر .

٧ ـ أمكن بهذه الطريقة تقدير قلويدات عديدة مثل سبارتيئين Sparteine ، ليوبانين Lupanine ، ليوبينين Lupinine ، أنجوستيفولين Angustifoline ، ١٣– هيدروكسي ليوبانين 13-Hydroxylupanine .

٦ ـ القواعد الطيارة الكلية Total Volatile Bases :

١ ـ أضف في دورق التقطير لوحدة كلداهل ١٠ جم عينة مفرومة + ٢ جم أكسيد ماغنسيوم + ٣ نقط سائل مانع للفوران (سيليكون أو إيزوأكتان) + ٣٥٠مل ماء مقطراً + قطع حجر خفاف لمنع الفرقعة .

٢ ـ ضع في قابلة الجهاز ٢٥ مل حمض بوريك ٢٪ + نقط من دليل (٠,٠٢٪ أحمر ميثيل ، ٠,٠١٪ أخضر بروموكريزول في إيثانول) .

٣ ـ شغل وحدة كلداهل بحيث تبدأ عملية الغليان في ظرف ١٠ دقائق ، واستمر في التقطير مع ثبات معدل التسخين لمدة ٢٥ دقيقة .

٤ ـ نقط المتقطر وحمض البوريك بحمض كبريتيك ٠,٠٥ عياري .

٥ ـ خذ ٢٥ مل حمض بوريك ٢٪ ونقط من الدليل ونقط بنفس الحامض كمقارنة .

٦ ـ احسب القواعد الطيارة الكلية بضرب الفرق بين حجمي حمض الكبريتيك المستخدمين للتنقيط في خطوتي رقم ٤ ، ٥ في ١٤ لاستنتاج التركيز بالمليجرام نيتروچين / ١٠٠ جم عينة .

وهذه القواعد الطيارة الكلية تشمل الأمينات الطيارة كثلاثي ميثيل أمين ، وثنائي ميثيل أمين ، والأمونيا الموجودة في اللحم ، وقد قدرت في لحوم الأسماك الطازجة بأقل من ٢٥–٣٠ مجم أزوت / ١٠٠ جم ، وزيادتها دليل فساد السمك .

٧ ـ الأحماض الدهنية الحلقية Cyclopropenoid Fatty Acids (CPFA) :

توجد الأحماض الدهنية الحلقية في بعض الزيوت وتؤدي إلى أضرار بيولوجية . ويتم تقديرها كالتالي :

١ ـ يتم ذوبان الزيت أو الدهن في دي إيثيل إيثير ، ويخفف بالإيثير إلى حجم معلوم .

٢ ـ ينقل ١ مل من مستخلص العينة أو من المحلول القياسي (يحضر طازجاً بإذابة

كمية معلومة من ميثيل ستيركيولات Methyl Sterculate حديث التحضير في دي إيثيل إيثير . وهذا الميثيل ستيركيولات يحضر أساساً من زيت Sterculia Foetida Oil) إلى أنبوبة اختبار .

٣ ـ يضاف إلى أنابيب الاختبار ١ مل دليل تلوين (٤ ٪ بلورات كبريت مونوكلينيك مذابة في ثاني كبريتيد كربون ، وتحضر بلورات كبريت مونوكلينيك بتسخين البيريدين إلى ٨٥°م ويضاف إليه كمية كافية من كبريت زهر لتشبيع المحلول ، ويبرد المحلول ويترك ليلة في ثلاجة على ٤°م للترسيب لفصل الراسب بالترشيح ، وبجفيف البلورات المرسبة ٢٤ ساعة هوائياً لإزالة البيريدين ، يطحن الكبريت إلى مسحوق ويخزن في آنية بنية اللون على حرارة الغرفة) + ٨ مل بيريدين للأسبكتروفوتومتر .

٤ ـ يجرى عمل مقارنة من نفس المحاليل .

٥ ـ تقلب الأنابيب بعد سدها وتخلط جيداً ، ثم توضع في حمام جليسرين على ٤٨°م لمدة ١٥ دقيقة ، ثم ترفع درجة الحرارة إلى ٩٥°م (يتطلب ذلك ٢٥ دقيقة) ويستمر عليها ٥ دقائق ، ثم ترفع درجة حرارة الحمام إلى ١٠٥°م ويستمر عليها ساعة .

٦ ـ برد الأنابيب ، وأكمل حجومها إلى ١٠ مل بالبيريدين واخلطها .

٧ ـ قس الكثافة الضوئية على ٥٠٥ نانومتر بعد ساعة بالضبط من إزالة الأنابيب من الحمام .

٨ ـ النيترات :

هناك تكنيك سريع نصف كمي Semiquantitative باستخدام ورق دليل (Merckoquant) في المستخلص المائي ، فتكون النيترات في هذا الاختبار مادة ملونة أزوتية حمراء بنفسجية . ويجرى تقدير النيترات / نيتريت في الأعلاف الخضراء كالتالي :

يوضع ٥٠ جم نباتات طازجة مجزأة + ٨٠ مل ماء مقطراً وتعجن في خلاط عادي بالخلط ، ثم تنقل العجينة الناتجة من الخلط بقليل من الماء المقطر إلى كأس زجاجي ، ويغسل الخلاط بالماء ويكمل الحجم الكلي إلى ٢٠٠ مل . يضاف إلى الكأس ٢٠ مل حامض ثلاثي كلورو الخليك تركيز ١٠ ٪ ، ويكمل بماء مقطر فاتر إلى ٥٠٠ مل . ويقلب جيداً ويترك ١٠ دقائق ثم يرشح ، يغمس ورق الدليل في الراشح ، ويستخرج ورق الدليل ليقرأ بعد دقيقتين ليقارن بتدريج لوني قياسي (مجم / لتر) وتحسب كمية النيترات بالمليجرام NO_3 لكل جرام عينة جافة .

٩ ـ النقاوة :

لحساب نقاوة الأملاح أو المعادن وأكاسيدها تعامل بحمض كبريتيك معلوم العيارية ، للتفاعل مع الأكاسيد ، ومعادلة باقي الحمض بقلوي معلوم العيارية ، ومنها تحسب النسبة

المئوية للأكاسيد ودرجة نقاوتها . وتكون عدد مكافئات الأكاسيد مساوية لعدد مكافئات الحمض المضاف أولاً مطروحاً منها عدد مكافئات الحمض المتبقية (المتعادلة مع القلوي) .

ففي الحجر الجيري تؤخذ عينة وتعامل بحمض HCl ، وتعادل الزيادة من الحمض بمحلول NaOH وفيما يلي مثال على حساب نسبة النقاوة .

عينة من الحجر الجيري وزنها ٠,٥ جم ، عوملت بحجم قدره ١٠٠ مل HCl ٠,١ عياري ولزم لمعادلة الزيادة من الحمض ٥٠ مل Na OH ٠,١ عياري ، فتكون عدد مكافئات HCl = عدد مكافئات الحجر الجيري + عدد مكافئات NaOH .

$$\text{٠,١٠٠} \times \text{٠,١} = \frac{\text{و}}{\text{٥٠}} + \text{٠,٠٥٠} \times \text{٠,١}$$

- حيث و = $CaCO_3$ وزن النقية في الحجر الجيري

٥٠ = الوزن المكافئ للكربونات

∴ و = ٠,٢٥ جم

- وتكون النسبة المئوية للنقاوة = $\frac{\text{وزن الكربونات النقية} \times \text{١٠٠}}{\text{وزن العينة}} = \frac{\text{٠,٢٥} \times \text{١٠٠}}{\text{٠,٥}} = \text{٥٠}\%$

- أو نسبة الشوائب المئوية = ٥٠٪ كذلك .

١٠ ـ فساد اللحوم :

يتم تتبع عمليات فساد اللحوم بالفحص الميكروبيولوچي لجودة اللحوم ، وكذلك من التقديرات الكمية الكيماوية المختلفة التي تشمل :

أ ـ تقدير النيتروچين الطيار الكلي (القواعد الطيارة الكلية وثلاثي ميثيل أمين) :

زن ١٠٠ جم عينة لحماً أو سمكاً مع ٣٠٠ مل حمض ثلاثي كلورو خليك ٥٪ وجنس في مجنس ، اطرد مركزياً أو رشح . انقل ٥ مل من المستخلص إلى جهاز تقطير الميكروكلداهل وأضف إليها ٥ مل صودا كاوية ٢ عياري ، وقطر ، واجمع على ١٥ مل حمض هيدروكلوريك ٠,٠١ عياري ، أضف دليلاً ١٪ حمض روسوليك في إيثانول وعاير بالصودا الكاوية ٠,٠١ عياري ، أضف ١ مل فورمالدهيد متعادل ١٦٪ لكل ١٠ مل سائل في قابلة المعايرة ، وأكمل المعايرة بالصودا الكاوية ٠,٠١ عياري . احسب تركيز القواعد الأزوتية مجم / ١٠٠ جم = $\frac{\text{١٤ (٣٠٠ + ر)} \times \text{ح١}}{\text{٥٠٠}}$

وأزوت ثلاثي ميثيل أمين / ١٠٠ جم = $\frac{\text{١٤ (٣٠٠ + ر)} \times \text{ح٢}}{\text{٥٠٠}}$

حيث إن ر = الرطوبة في العينة مجم / ١٠٠ جم .

$ح_1$ = حجم الحامض القياسي المستهلك في المعايرة الأولى .

$ح_2$ = حجم الحامض القياسي المتحرر في المعايرة الثانية .

والأزوت الطيار الكلى في معظم لحوم الماشية يعتبر مقبولاً لو لم يرتفع عن ١٦,٥ مجم أزوت / ١٠٠ جم .

ب ـ الأحماض الدهنية الحرة للدهن المستخلص :

تستخلص العينة بالكلوروفورم ، وترشح على كبريتات صوديوم لامائية . قدر محتوى الدهن في جزء من الراشح معلوم الحجم ، اخلط ٢٥ مل راشحاً مع ٢٥ مل كحولا متعادلاً ، وعاير الأحماض الدهنية الحرة بالصودا الكاوية ٠,١ عياري مع وجود دليل فينولفثالين . معظم عينات اللحوم البقرية تعتبر مقبولة إذا لم ترتفع نسبة الأحماض الدهنية الحرة عن ١,٢ ٪ كحمض أوليك في الدهن المستخلص .

جـ ـ رقم بيروكسيد الدهن المستخلص :

يؤخذ جزء من راشح الكلوروفورم (من التقدير السابق) ويقدر فيه رقم البيروكسيد الذي تتراوح قيمته في عينات اللحوم البقرية بين صفر و ١ ملي مول / كجم دهناً مستخلصاً ، ولا تعتبر العينة مقبولة لو زاد رقم البيروكسيد فيها عن ٥ .

١١ ـ اختبار الكبريتيد « لإبر » Eber's Sulphide Test :

يجرى هذا الاختبار لتقدير مدى تلف مساحيق السمك أو اللحم ، وذلك على النحو التالي :

١ ـ ضع ٥ جم مسحوق سمك أو مسحوق لحم في دورق مخروطي سعة ٢٥٠ مل .

٢ ـ عدّ سدادة فلين لإحكام غلق فوهة الدورق تماماً ، ويثبت في الفلين شريط من ورق الترشيح الأبيض بطول ٥ سم وعرض ٧٥ م ، مع غمس أحد أطرافها في السدادة بشقها من الجهة البطنية للسدادة ، بحيث إنه عند غلق الدورق يكون الشريط مدلى باستقامة في مركز الدورق ولا يلامس أي جانب للدورق .

٣ ـ خفف ٥ مل من حامض الكبريتيك المركز بالماء المقطر حتى تصل إلى حجم كلي ٥٠ مل ، ويوضع هذا الحامض المخفف في الدورق مع عدم ملامسة الحامض لجوانب الدورق .

٤ ـ حرّك الدورق حتى تبتل كل العينة، مع عدم بلل شريط الورق أو جوانب الدورق.

٥ ـ رطب شريط ورق الترشيح بمحلول مشبع من خلات الرصاص ، مع عدم زيادة الرطوبة حتى لا تجعل الشريط ينقط في الدورق ، حيث إن وصول خلات الرصاص مباشرة بحامض الكبريتيك يؤدي إلى تلف الاختبار .

٦ ـ أدخل سدادة الفلين بشريط الورق المبلل بالخلات إلى الدورق وأحكم الغلق ، واتركه في حجرة دافئة لمدة ١٦ ساعة . عادة في نهاية الساعات (الخمس أو الست ساعات الأخيرة) تتلون شرائط الورق بلون بني Tan إذ يتغير اللون من الأصفر الفاتح Light Buff إلى البني Brown إلي الأسمر Black ، وكلما ازداد اللون غمقة وأسرع في ظهوره كلما أظهر دلالة وجود تلف بالمنتجات المختبرة . فإن تلون الشريط باللون البني في ظرف ١-٣ ساعات دل على خطورة المشاكل الناجمة عن تلف مكونات العينة . وإذا تلون الشريط فقط بلون أصفر Slightly Tan أو Tinted في نهاية الساعات الستة عشر فإنه عادة يكون دليلاً على أمان استخدام هذه المادة المختبرة في التغذية الحيوانية .

ووجود دليل على تلف مادة العلف المختبرة يكفي لاستبعادها من تغذية الحيوان ، وإلا أدت لاضطرابات ومشاكل .

١٢ ـ الأضرار الميكانيكية للحبوب :

قد يتسبب الحصاد المبكر جداً أو التجفيف الشديد جداً إلى أضرار ميكانيكية للحبوب تؤدي لخطر من الإصابة الفطرية الثانوية . وللكشف عن الأضرار الميكانيكية نوعياً توضع الحبوب في محلول يود – يوديد بوتاسيوم (٠,٢ جم يود + ٠,٤ جم يوديد بوتاسيوم / ١٠٠ مل ماء) ، وترج جيداً وبعد ١-٥ دقائق يصب المحلول . في حالة الحبوب التالفة يظهر تلون في الشقوق وأماكن الكسور (تلون أسمر مزرق من تفاعل النشا من اليود) باستخدام عدسة مكبرة .

١٣ ـ السموم الفطرية :

رغم استخدام الطرق البيولوچية في الكشف عن السموم الفطرية ، فإن الكروماتوجرافي بأنواعه هو أساس التقدير الكمي لهذه السموم فاستخدمت الأعمدة والرقائق والنظم السائلة والصلبة والغازية والمناعية (Enzime Linked Immunosorbent Assay, ELISA) .

وتباع مستحضرات سابقة التجهيز Kits الآن لتقدير بعض السموم الفطرية .

أ ـ سموم فطر Pithomyces chartarum :

يطلق على هذا الفطر كذلك اسم Sporodesmium bakeri ، ويسبب إكزيما الوجه Facial eczema المرتبطة بأمراض الكبد وحساسية الغنم والبقر من الضوء ، فتعرف بإكزيما الوجه . ويجرى اختبار يعرف باختبار الكأس Beaker Test لمعرفة إمكانية سمية المراعي كالتالي :

٥٠ جم عينة حشائش مطحونة تستخلص بحوالي ١٠٠ مل أسيتون . يوضع الأسيتون على عمود كروماتوجرافي Column Chromatography يحتوي من أسفل كربون ممتص ومن أعلى ألومنيا ، ويضاف كثير من الأسيتون ويستبعد أول ٧٥ مل ، ويجمع ثاني ٧٥ مل في

كأس ويبخر للجفاف ، فالاختبار الموجب يعرف بالراسب الأبيض على جدران الكأس . هذه المادة ليست هي التوكسين لكنها دليل على وجود الفطر لأنها والتوكسين ناتجان من الفطر، ولكن وجود هذه المادة ليس دليلاً على سمية الحشائش ، ولكن سمية الحشائش تختبر بتغذيتها لخنازير غينيا . فيستخلص ١ ك حشائش سامة / خنزير غينيا بالإثير ، ويضاف هذا الإثير على عليقة ٣ أسابيع عادية ، وبعد تطاير الإثير تغذى عليها ٣ أسابيع ، وفي الرابع عليقة عادية ، ثم تفحص الخنازير للتغييرات المرضية بالكبد وقنوات الصفراء .

وتفحص سمية هذه الفطريات بتنميتها على ٢٠٠ مل بيئة بطاطس / جزر لمدة ٧ أيام على ٢٥ْم ، وتستخلص البيئة بالإثير كما استخلصت الحشائش من قبل ويغذى المستخلص كذلك لخنازير غينيا . هذا السم (سبورو ديسمين) ذائب في الماء .

ب ـ قلويدات الإرجوت Ergot Alkaloids :

تجمع الإرجوت من الحبوب الملوثة ويتم طحنها . يخلط ٢,٥ جم مسحوق إرجوت مع ٠,٣ جم بيكربونات صوديوم ، ويضاف إليها ماء لعمل عجينة ، تستخلص بمقدار ١٠٠ مل إيثير إيثيلي ويرج لمدة ساعة ، ويكرر الاستخلاص ٣ مرات . تجمع المستخلصات وتجزأ مع ١٠ مل حمض طرطريك ١٪ ، ويكرر هذا التجزيء ٣ مرات . اجمع مستخلصات حمض الطرطريك وأكمل الحجم إلى ٥٠ مل بنفس الحمض للتحليل النوعي بتغيير اللون أو على رقائق الكروماتوجرافي كالتالي :

أ ـ يؤخذ ٥ مل من المستخلص الأخير مع ١٠ مل دليل فان يوركس ذو كلوريد الحديدوز (٠,١٢٥٪ بارادي ميثيل أمينو بنزالدهيد في ٦٥٪ حمض كبريتيك ، أضف ٠,١ مل محلول كلوريد حديدوز ٥٪ لكل ١٠٠ مل دليل فان يوركس) . فإذا وجدت قلويدات الإرجوت يتحول لون المحلول إلى الأزرق في ٣ أيام .

ب ـ خذ ١٠ مل مستخلص حمض طرطريك واضبط حموضته على ٨,٥ بهيدروكسيد الأمونيوم . استخلص بحجم مساو من الكلوروفورم . جفف طبقة الكلوروفورم بالتبخير . أذب في ٠,٥ مل كلوروفورم . بقع على رقائق سليكاچيل ، وكذلك بقع بمحلول إرجوت قياسي . طور الرقائق في خلات إيثيل / دي ميثيل فورمايد / إيثانول ١/١,٩/١٣ . افحص الرقائق تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية قصير الموجة فيظهر فلورسنت أزرق لقلويدات الإرجوت . وإذا لم يظهر الفلورسنت فترش الرقائق بدليل ٣,٥٪ بارادي ميثيل أمينو بنزالدهيد في حمض هيدروكلوريك مركز .

جـ ـ حمض التريك Terreic Acid :

تستخلص العينة بخلات الإيثيل ، وتركز المستخلصات بالتبخير تحت تفريغ ، ثم ينقى ويفصل حمض التريك على رقائق كروماتوجرافي سليكاچيل منشطة لمدة ساعة على

١٢٠ْم، مع تبقيع محلول قياسي كذلك للمقارنة .

طور الرقائق في مخلوط تولوين / خلات إيثيل / حمض فورميك ١/٤/٥ ، ثم جففها هوائيا ، وافحصها تحت أشعة فوق بنفسجية . علم حول البقع البنية الداكنة ، واقشطها واستخلص منها حمض التريك بالماء (١ مل) واطرد مركزيا ، ثم خذ ٠,٥ مل من الرائق للتقدير الضوئي بعد المعاملة بأي من دليلي اللون :

١ ـ دليل الفولين Folin's Reagent : بأخذ ٠,٥ مل مستخلصاً + ١ مل دليل اللون + ٢ مل محلول كربونات صوديوم ١٥٪ وخفف إلى ١٠ مل بالماء ، وبعد ١٥ دقيقة قدر الكثافة الضوئية على طول موجة ٦٢٠ نانومتر .

٢ ـ دليل ٢-٤- دي نيتروفينيل هيدرازين : ٠,٥ مل مستخلصاً + ٣,٥ مل ماء + ١ مل دليل لون (١٠٠ مجم في ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ٢ عياري) + ٥ مل صودا كاوية ١,٥ عياري ، قدر الكثافة الضوئية خلال ٥ دقائق على طول موجة ٥٤٠ نانومتر .

د ـ الروبراتوكسين Rubratoxin :

استخلص ١٠٠ جم عينة بمقدار ٣٠٠ مل خلات إيثيل بالهز ليلة بسرعة ٣٥٠ لفة / دقيقة . رشح وبخر المترشح إلى ٢٠ مل . بقع على رقائق كروماتوجرافي تحت تيار نيتروچين لمنع الأكسدة . بقع ٥ ميكروجرام روبراتوكسين في محلول قياسي للمقارنة . طور الرقائق في مخلوط كلوروفورم / ميثانول / حمض خليك ثلجي / ماء ١/١/٢٠/٨٠ . جفف الرقائق هوائيا ثم في فرن على ٢٠٠ْم لمدة ١٠ دقائق . افحص الرقائق أسفل أشعة فوق بنفسجية طويلة الموجة ، فيظهر الروبراتوكسين بفلورسنت مخضر . يمكن رش الرقائق بمحلول ٢-٧- دي كلوروفلورسين فيظهر الروبراتوكسين بفلورسنت أخضر مصفر تحت الأشعة فوق البنفسجية طويلة الموجة .

هـ ـ السيترينين Citrinin :

في طريقة Abdelhamid, 1981 لتقدير السيترينين في مختلف مواد العلف ، تطحن العينة ويؤخذ منها ٢٥ جم + ١٠٠ مل كحول ميثايل / ماء مقطر (٧٠/٣٠) وتخلط ٥ دقائق في خلاط عادي ، ثم تضاف كربونات صوديوم عيارية حتى PH ٨-٩ ، ويضاف ٦٠ مل إثير بترولي ، ويخلط ٥ دقائق أخرى ، وتطرد مركزيا ٥ دقائق ، ويرشح الرائق على ٠,٥ جم Celite لمساعدة الترشيح ، ويدون حجم الراشح ، ويخلط مع ١٠٠ مل كلوروفورم للترويق وإزالة الدهون في دورق فصل بالرج ، ويؤخذ السائل العلوي + يد كل ٢ عياري حتى PH ١,٨-٢,٤ + ١٠٠ مل كلوروفورم للاستخلاص ويرج للفصل ، وترشح طبقة الكلوروفورم السفلى على ١ جم كبريتات صوديوم لامائية ، وتستقبل في دورق سعة ٢٥٠مل ، ويجفف

على حمام مائي تحت تفريغ على ٤٠°م ، ثم ينقى على عمود قصير Sep Pak C_{18} بحوالي ٢ مل ميثانول ، تستقبل في قنينة صغيرة ، ويغسل العمود بحوالي ١ مل أخرى ، ويبخر الميثانول للجفاف على ٥٠°م تحت تفريغ ، وتنتقل بحوالي ٢٠ ميكرولتر على رقائق كروماتوجرافي . يعد العمود بغسيله بحوالي ٥ مل ميثانول ، ثم ٥ مل ماء مقطراً ، ولمعادلته بعد استخدامه يغسل بواسطة ٥ مل من كل من الميثانول ، ديوكسان ، ميثانول .

وتطور الرقائق في كلورفورم / أسيتون / إيثانول / ماء مقطر (١/١٠/٤٠/٦٠) ، وتفحص الرقائق أسفل أشعة فوق بنفسجية (٢٥٤ نانومتر) ، أو على جهاز مقياسى كثافة الفلورسنت لرقائق الكروماتوجرافي TLC - densitometer على طول موجة ٢٥٤ نانومتر (فلتر رقم ٥٧) .

ويحسب تركيز السيترينين من المعادلتين :

(في حالة استخدام محلول قياسي خارجي) $Cs = \frac{Cst \times D}{R}$

(في حالة استخدام محلول قياسي داخلي) $= Cst \times D$

حيث إن Cs = تركيز الستيرينين في العينة جزء / بليون ، Cst = تركيز المحلول القياسي من السيترينين جزء / بليون للمحلول الداخلي أو نانوجرام / بقعة للمحلول الخارجى ، D = معامل التخفيف ، R = ما يمكن إعادة اكتشافه وهو ٨٥٪ في مدى ١٠٠–٦٠٠ جزء / بليون .

هذا ويمكن قياس السيترينين كذلك على جهاز الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط (الأداء) .

و ــ الباتيولين Patulin :

تستخلص وزنة من الحبوب ٥٠ جم بأسيتونيتريل / هكسان (١/٤) ، وبالتبخير نتخلص من معظم المذيب حتى الجفاف ، فيؤخذ التوكسين في ١ مل كلوروفورم ثم تنقى على رقائق كروماتوجرافي سيليكاچيل ، وتقدر كميا بعد ذلك بالتبقيع ثانية على رقائق كروماتوجرافي سيليكاچيل بتطويرها في بنزين / ميثانول / حامض خليك (٩٠/٥/٥) ، وتقارن بصريا مع محلول قياسي تركيز ٤٠ جزء / بليون ، ويمكن رش الرقائق لعمل مشتق فينيل هيدرازين لتأكيد النتائج .

وفي عصير الفواكه يمكن اكتشاف الباتيولين بحساسية ٥ أو ٢٠ جزء / بليون بالكروماتوجرافي الغازي أو رقيق الطبقات على الترتيب . فيمكن استخلاص ٥٠ مل من عصير التفاح أو الجريب بمقدار ٥٠ مل من خلات الإيثايل (٣ مرات) وتغسل المستخلصات بمقدار ٢٠ مل كربونات صوديوم ١,٥ ٪ وتجفف على ٢٠ جم كبريتات صوديوم وتركز إلى ١–٢ مل على حمام مائي في وجود النيتروچين وتنقل إلى قنينة أصغر

وتجفف ثم يذاب الراسب في ٠,٥ مل خلات إيثايل / ميثانول (٩٠/١٠) للتحليل على الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء ذي عمود Partisil - 10 ODS فيمكن اكتشاف حتى ١ جزء / بليون بإعادة اكتشاف أعلى من ٨٠٪ .

ز ـ استريجماتوسيستين Sterigmatocystin :

يجرى الكشف عنه باستخلاص وزنة معلومة من العينة المطحونة ، وذلك بالكلوروفورم ، أو مخلوط أسيتونيتريل / ماء مقطراً (١/٩) ، ويرشح وينقى بالهكسان ، ويبخر المستخلص لأقل حجم مكن ، ثم ينقى ويفصل على رقائق كروماتوجرافي سليكاچيل ، وبعد التطوير ترش الرقائق بهيدروكسيد بوتاسيوم ، أو كلوريد ألمونيوم ، أو حمض كبريتيك والتي تعطي تغييرات لونية واضحة .

ويمكن تمييز حتى ٣٠ جزءاً / بليون . وقد تتداخل الصبغات المرافقة للعينة وذات الفلورسنت الأحمر مع التوكسين وتضلل النتائج .

والتحليل بجهاز مطياف الكتلة Mass - Spectrometer يؤكد نتائج التحليل بواسطة رقائق الكروماتوجرافي ، ويستخدم للتقدير الكمي بنجاح . وإذا أذيب التوكسين في البنزين فتطور رقائق الكروماتوجرافي في مخلوط بنزين / حمض خليك / ميثانول ٥/٥/٩٥ ، وتجفف وترش بكلوريد ألمونيوم ٢٠٪ ، وتجفف ١٠ دقائق على ٨٠°م وتفحص تحت أشعة فوق بنفسجية قصيرة الموجة فيظهر فلورسنت أصفر .

ولقد ذكر Kingston & Chen, 76 طريقة باستخدام الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط لفصل الاستريجماتوسيستين وغيره من نواتج ميتابوليزم الاسبرجيلس فرزيكلور (ميثوكسي ستريجماتوسيستين ، دي ميثيل ستريجماتوسيستين ، فرزيكلورين A ، فرزيكلورين C ، أفروفين، أفرموتين) باستخدام عمود سليكاچيل (Partisil 10) ووسط متحرك من الهكسان/ كلوروفورم / حمض خليك (١/٣٥/٦٥) .

حـ ـ التوكسين PR (وحمض الميكوفينوليك) :

ذكر Amend & MUller, 84 طريقة للتقدير فيها تطحن ٢٥ جم عينة ثم تستخلص بالماء المقطر (١٠٠ مل) وتحمض بحمض الهيدروكلوريك ٠,٢ ع حتى 1 PH ثم تستخلص بمقدار ١٠٠ مل كلورفورم أو خلات إيثايل أو خليطهما (١/١) لمدة نصف ساعة وتكرر ٣ مرات ثم تسحب الطبقة العضوية وتجفف على كبريتات صوديوم ثم تبخر تحت تفريغ على ٤٥°م حتى حجم ٥ مل للتقدير المباشر أو تنقى على عمود من السليكاچيل باستخدام هكسان / خلات إيثيل (٣٠/٧٠) ثم (٤٠/٦٠) ثم (٥٠/٥٠) بمقدار ٥٠ مل من كل مخلوط ويستبعد أول ١٠٠ مل من الغسول ويجمع ما بعد ذلك إذ يحتوي التوكسين PR ، وللحصول على حمض الميكوفينوليك يغسل العمود بمقدار ٢٠٠ مل كلورفورم / ميثانول

حمض خليك (٩٧/٢/٢, ٠) ويجفف المستخلص تحت نيتروجين ثم يذاب الراسب في ١ مل من المذيب للتقدير الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء . فكانت نسبة المعاد اكتشافه من التوكسين PR ٢-٢٠٪ ومن حمض الميكوفينوليك ٣٥-٨٥٪ .

والكروماتوجرافي السائل عالي الأداء مكون من عمود من وسط ثابت RP8 ووسط متحرك من الماء / أسيتونيتريل (٤٠/٦٠) للتوكسين PR بينما يتكون من الماء / أسيتونيتريل/ حمض خليك (٢/٤٠/٦٠) لحمض الميكوفينوليك .

وللتقدير النوعي يمكن استخدام الكروماتوجرافي رقيق الطبقات من السليكاچيل وتطور في تولول / خلات إيثايل / ٩٠٪ حمض فورميك (١٠/٤٠/٥٠) في الاتجاه الأول ثم في دي إيثيل إيثير / ن ـ هكسان / ٩٠٪ حمض فورميك (٤, ٠/٤٠/٦٠) ثم ترش بحمض الكبريتيك ٥٠٪ فتظهر التوكسينات بفلورسنت أخضر تحت الأشعة فوق البنفسجية (٣٦٦ نانومتر) وبالتسخين على ١٠٠°م ٢-٣ دقائق يتلون بالبني المصفر بحدود كشف ٠,٥-١,٥ جزء / مليون من كل من التوكسينين .

ط ـ حمض البنسليك :

يتم الاستخلاص بثاني كلوريد الميثان والميثانول (١/١) ثم الترشيح ، جفف أول ١٠٠ مل على ٢٠ جم كبريتات صوديوم وأعد الترشيح ، بخر على ٤٠°م تحت تفريغ ، أذب المتبقيات في أسيتونيتريل واغسله بالهكسان ، ثم جفف الأسيتونيتريل على ١٠ جم كبريتات صوديوم مع الترشيح ، بخر على ٤٠°م تحت تفريغ ، أذب في كلوروفورم للتبقيع على رقائق الكروماتوجرافي ، بالرش بالداي فينيل حمض بوريك ٢- أمينو إيثيل استر ينتج مشتق قوى الفلورسنس إذ تتناسب شدة الفلورسنس مع تركيز التوكسين . ومعدل الاكتشاف بهذه الطريقة حوالي ٩٥٪ وأقل حد يمكن اكتشافه من التوكسين حوالي ٥ نانوجرام / بقعة .

ي ـ الأوكراتوكسين Ochratoxin :

تستخلص ٢٠ جم عينة بمخلوط كلوروفورم / ميثانول ١/١ (١٠٠ مل) لمدة ١٠ دقائق في خلاط ، تطرد مركزيا ويؤخذ ٥٠ مل رائقاً + ٥٠ مل بيكربونات صوديوم ١, ٠ عياري لضبط PH إلى ٩ ، ويرج في قمع فصل ، وتهمل الطبقة السفلى (كلوروفورم) . الطبقة المائية يضاف إليها ٧٥ مل كلوروفورم ، وترج في قمع فصل ، تهمل طبقة الكلوروفورم السفلى ، وتؤخذ الطبقة المائية مع حوالي ١٢ مل حمض هيدروكلوريك ٢ عياري لضبط PH على حوالي ٢ ، ثم يضاف ١٠٠ مل كلوروفورم وترج في قمع فصل ، وتهمل الطبقة المائية العليا . تؤخذ طبقة الكلوروفورم السفلى ، وترشح على ١ جم كبريتات صوديوم لامائية ، وتجفف بالتبخير على ٥٠°م ، ثم تذاب المتبقيات في ٢٠٠ ميكروليتر

ميثانول للفصل للتوكسين على رقائق كروماتوجرافي أو على الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (HPLC) .

وبعد تبقيع رقائق الكروماتوجرافي ، يتم تطويرها في مخلوط تولوين / حمض خليك / حمض فورميك ١/٣/٦ ، ثم ترش الرقائق بحمض كبريتيك ٣٠٪ في ميثانول ، ثم تسخن الرقائق ٢ دقيقة على ١٠٥°م ، وتفحص تحت ضوء فوق بنفسجي ٣٦٦ نانومتر ، فيعطي الأوكراتوكسين فلورسنت أزرق مخضراً ، ويمكن اكتشاف حتى ٤ جزء / بليون ، والمعاد اكتشافه بهذه الطريقة يبلغ حوالي ٥٠٪ .

أما ظروف الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء فهي الضغط ٢٠٠٠ رطل على البوصة المربعة ، العمود ٢٥ سم × ٤ م مملوءاً بأسفير يسورب حجم جزيئاته ٥ ميكرومتر ، الغسيل بميثانول / ماء مقطر (٧٠/٣٠) + ١٪ حمض خليك مركز ، واكتشاف التوكسين على إثارة ٣٦٦ نانومتر وانبعاث ٤٦٨ نانومتر . وبهذه الطريقة يمكن اكتشاف حتى ٢ جزء / بليون أوكراتوكسين أ .

هذا ويمكن فصل الأوكراتوكسين على عمود قصير من السليكاچيل أو السبيليت فيظهر التوكسين في نهاية العمود السفلى بلون أزرق تحت أشعة فوق البنفسجية طويلة الموجة ، وبهذا التكنيك يمكن اكتشاف حتى ١٢ جزء / بليون .

أوكراتوكسين البول Urine Ochratoxin :

إذا لم يستخلص البول مباشرة عقب جمعه فيجب حفظه بالتجميد . حمض ٥٠ مل بول بحمض الهيدروكلوريك المركز إلى PH ٢ ، ثم استخلص في قمع فصل بالكلوروفورم (٧٥ مل × ٢ مرة) . بخر مستخلص الكلوروفورم إلى الجفاف ، أعد إذابة المتبقيات في ٢ مـل بنزين / أسيتونيتريل ٢/٩٨ . بقـع على رقائق الكروماتوجرافي ، ثم طـور في كلوروفورم / ميثانول / حمض فورميك ١/٢/٩٧ ، ثم عرض الرقائق بعد جفافها إلى بخار الأمونيا فيظهر الأوكراتوكسين فلورسنت أزرق تحت الأشعة فوق البنفسجية .

هذا وطورت طريقة مناعية – إنزيمية ELISA لتقدير أوكراتوكسين A بدقة اكتشاف ٨٥– ٩٠٪ فى مدى ١ ــ ٣٠ جزء / بليون .

ك ــ الأفلاتوكسينات Aflatoxins :

ذكرت ما يزيد عن ٤٠٠ طريقة لقياس الأفلاتوكسينات في مواد العلف والأغذية المختلفة في بذور القطن يستخلص أولاً الجوسيبول باستخدام چيل هيدروكسيد الحديديك (١٥٪ كلوريد حديديك + ٤٪ أيدروكسيد صوديوم حتى PH ٤,٦–٤,٨) ثم استخلاص الأفلاتوكسين بمخلوط أسيتون / ميثانول / ماء (١/٢/٢) . أو قد يستخلص الأفلاتوكسين مباشرة بمخلوط أسيتون / ماء / حامض خليك (٨٥٠ مل / ١٥٠ مل / ٨ مل) ،

وينقى بخلات الرصاص أو خلات الزنك ، ثم ينقل إلى كلوروفورم وينقى على عمود كروماتوجرافي ، ويفصل ويقدر بالكروماتوجرافي رقيق الطبقات أو السائل عالي الأداء ، ويتحقق من الأفلاتوكسين بالرش بحمض الكبريتيك الميثانولي أو بواسطة مطياف الكتلة Mass Spectrometry .

وقد يستخلص الأفلاتوكسين بالميثانول ، ويعامل المستخلص بمحلول كبريتات زنك – كلوريد صوديوم حامضي (١٥٠ جم كبريتات زنك + ١٥٠ جم كلوريد صوديوم + ٣,٧٥ مل حمض خليك ثلجي ويكمل إلى لتر بالماء) ثم يرشح ويخفف بالماء ويقاس الفلورسنس بجهاز Electronic Photofluorometer .

وفي الذرة يؤخذ ٥٠ جم عينة مطحونة + ١٠ جم رمل مغسول بالحامض (Diatomaceous earth أو Celite) وتستخلص بالأسيتون / ماء (١٥/٨٥) ١٥٠ مل بالخلط ٣ دقائق والترشيح ، ثم نقل ٥٠ مل من الراشح إلى قمع فصل وترج مع بنزين ، ثم تجفف على كبريتات صوديوم ، بنقل طبقة البنزين (٣ مل) إلى قنينة صغيرة من خلال كبريتات صوديوم ، وينقع فيها العمود القصير Minicolumn (أنابيب ٥ م × ٢٠ سم مسدودة بقطن نقي ومملوءة بأكسيد ألومنيوم بارتفاع ١,٥ سم + سيليكاچيل بارتفاع ٩ سم ثم تغطى بقطعة قطن) من الطرف القصير المسدود ، ويترك العمود يمتص المستخلص حتى يصل المستخلص إلى ١ سم أعلى منطقة أكسيد الألومنيوم ، فيزال العمود ويجفف البنزين من السطح الخارجي للعمود ، ويدخل مباشرة في ٥ مل محلول تطوير من كلوروفورم / أسيتونيتريل / إيزوبروبانول (٢/٥/٩٣) في أنبوبة اختبار صغيرة ، وطور لمدة ٥ دقائق . افحص العمود المطور أسفل ضوء UV طويل الموجة فيظهر الأفلاتوكسين كشريط فلورسنتي أزرق شديداً أعلى منطقة أكسيد الألومنيوم بحوالي ١ سم . وحدود الكشف حوالي ١٠ ميكروجرام / كيلو (جزءاً / بليون) .

وقد طور Abdelhamid, 1981 طريقة لقياس الأفلاتوكسينات في العديد من مواد العلف بأن تستخلص ١٠ جم عينة مطحونة مع ٧٨ مل أسيتون / ماء (٣٥/٦٥) + ٢ مل ٢٠٪ خلات رصاص في حمض خليك بالخلط ٥ دقائق ، والطرد المركزي ٥ دقائق ، ثم يؤخذ ٢٠ مل من الرائق العلوي بماصة على عمود كروماتوجرافي سابق التجهيز Extrelut ، ويترك للتشرب ١٠ دقائق، ثم يغسل العمود من الشوائب بإثير / ن ـ هكسان (٤٠/٢٠) ٤٠ مل، ثم ٤٠ مل ن ـ هكسان ، ثم تستخلص الأفلاتوكسينات بالكلوروفورم / ن ـ هكسان (٥٠/٥٠) ١٥٠ مل ، ويستقبل المستخلص هذا في دورق سعة ٢٥٠ مل ، ويبخر تحت تفريغ على ٤٠°م ، ثم ينقل كميا بالكلوروفورم إلى قنينة صغيرة ، وتجفف تحت تفريغ على ٤٠°م في حمام مائي Rotary Vacuum Evaporator ، ثم يذاب التوكسين في ١٠٠

ميكرولتر للفصل على الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) ، أو في ٢٠ ميكروليتر (كلوروفورم) للفصل على الكروماتوجرافي رقيق الطبقات Thin Layer Chromatography (TLC) .

ظروف الكروماتوجرافي السائل : على حرارة الغرفة ، سرعة سريان سائل التطوير ١ مل / دقيقة ، ضغط حوالي ٨٠٠ رطل / بوصة مربعة (P. S. I.) ، العمود معبأ بمادة Lichrosorb Si_{60} ٧ ميكرومتر ، سائل التطوير كلوروفورم / إيزو أوكتان (٧٥/٢٥) + ٢٪ ميثانول وجميعهم من درجة Lichrosolv ، طول موجة الكاشف فوق البنفسجي UV-Detector ٣٦٥ نانومتر ، بينما طول موجتي الكاشف الفلورسنتي Fluorescence Detector ٣٦٥ ، ٤٣٣ نانومتر .

ويتم حساب تركيز التوكسين من المعادلتين:

(في حالة المحلول القياسي الخارجي) $$Cs = \frac{Ps \times Cst \times D}{Pst \times R}$$

(في حالة المحلول القياسي الداخلى $$Cs = \frac{Ps \times Cst}{Pst}$$

حيث إن Cs = تركيز الأفلاتوكسين بالعينة جزء / بليون ،

Ps = مساحة مسطح منحنى التوكسين للعينة ،

Cst = تركيز الأفلاتوكسين للمحلول القياسي ميكروجرام/ مل للمحلول الخارجي أو جزء / بليون للمحلول الداخلي ،

Pst = مساحة مسطح منحنى التوكسين للمحلول القياسي ،

D = معامل التخفيف (٠,٨) ،

R = المعاد اكتشافه (٨٥٪) ،

ظروف Tlc : محلول التطوير تولول / حامض خليك / حامض فورميك (١/٣/٦) ، وللتثبيت استخدم دليل الرش حامض كبريتيك ٣٠٪ في ميثانول ، تسخين ٢ دقيقة على ١٠٥°م ، والفحص تحت الأشعة البنفسجية ٣٦٦ نانومتر .

ويتم الحساب لتركيز التوكسين من المعادلتين :

(للمحلول القياسي الخارجي) $$Cs = \frac{Ps \times Cst \times D}{Pst \times R}$$

(للمحلول القياسي الداخلي) $$Cs = \frac{Ps \times Cst}{Pst}$$

حيث إن Cs = تركيز الأفلاتوكسين بالعينة جزء / بليون ،

Cst = تركيز الأفلاتوكسين بالمحلول القياسي الخارجي (نانوجرام / بقعة)

أو الداخلي (جزء / بليون) ،

D = معامل التخفيف (٠,٤) ،

R = المعاد اكتشافه (٨٥٪) .

ويظهر أفلاتوكسين ب١ ، ب٢ ، جـ١ ، جـ٢ عند Ratio of Flow (Rf) ٠,٤٤ ، ٠,٤٠ ، ٠,٣٥ ، ٠,٣٠ على الترتيب بفلورسنت أزرق (ب) وأخضر (جـ) ، وحدود الكشف على HPLC ٥ جزء / بليون من كل أفلاتوكسين ، بينما على TLC ٢ جزء / بليون في مدى ١٠-٢٠٠ جزء / بليون .

وقد لوحظ اختلافات في تركيزات الأفلاتوكسين في نفس العينة عند تحليلها في معامل متعددة ، وهذه الاختلافات تكون كبيرة (± ٥٠٪) في القيم المتوسطة للتركيزات المنخفضة من أفلاتوكسين ب١ (١٠-٢٠ ميكروجرام / كجم) ، وتبلغ الاختلافات ± ١٠ ميكروجرام / كجم بزيادة تركيز الأفلاتوكسين (٢٠-٥٠ ميكروجرام / كجم) ، بينما تكون الاختلافات بين المعامل المختلفة متوسطة (± ٢٠٪) للتركيزات الأعلى من ٥٠ ميكروجرام / كجم .



(شكل ٤٤)

تقدير الأفلاتوكسين بأعمدة التجاذب (أفلاتست Aflatest 10) ذات الأجسام المضادة في دقائق قليلة

الحدود المسموح بتواجدها فى الأعلاف من أفلاتوكسين ب (مجم / كجم)

العلف	التركيز المسموح بتواجده (مجم/كجم)
لماشية التسمين	٠,٠٥٠
للأغنام	٠,٠٥٠
للعجول	٠,٠٢٠
للدجاج البياض	٠,٠١٢
للماشية الحلابة	٠,٠١٠
لكتاكيت تسمين	٠,٠٠٨
للرومي	٠,٠٠٨

تقدير الأفلاتوكسينات في الحبوب واللبن :

يؤخذ ٢٥ جم دقيقاً أو مطحون حبوب ، ويستخلص ٨ ساعات في جهاز سوكسلت للتنقية ، يبخر الإثير البترولي على حرارة الغرفة ، ثم تنقل العينة إلى إناء مع ٢٥ مل ماء ، ثم تستخلص مرتان بالكلوروفورم (١٢٥ مل × ٢ مرة) على هزاز لمدة ٣٠ ثانية . اجمع الكلوروفورم ورشحه على ١٠ جم كبريتات صوديوم لامائية . كثف الكلوروفورم تحت تفريغ إلى ٢ مل [قد تتطلب بعض العينات تنقية مرة أخرى على عمود كروماتوجرافي] . تفصل الأفلاتوكسينات على رقائق كروماتوجرافي منشطة ساعتان على ١٠٥°م ، فتبقع وتطور في كلوروفورم / أسيتون ١٠/٩٠ ، أو بنزين / إيثانول / ماء ١٩/٣٥/٤٦ (الطبقة العليا) ، يبخر المذيب ، ترش الرقائق بمحلول حمض كبريتيك ٢٥ ٪ . تفحص الرقائق على دنسيتوميتر لتحديد تركيز الأفلاتوكسينات $B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2$.

ولقد استخدم الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء لفصل الأفلاتوكسينات (B, G, M) في النقل والألبان باستخدام عمود سليكاجيل بحدود اكتشاف ٠,٠٥ - ٢,٠ نانوجرام، واستخدم كذلك لفصل نواتج أكسدة أفلاتوكسين B_1 (Q ، M_1 ، B_{2a} ، H_1 (أفلاتوكسيكول)) كما استخدم الكروماتوجرافي رقيق الطبقات لفصل نواتج أكسدة B_1 كذلك .

أفلاتوكسين M_1 في منتجات الألبان :

تخلط العينة (٥٠ مل لبنا ، أو ٥ جم مسحوق لبن ، أو ٥٠ جم جبناً) مع ١٢٠ مل كلوروفورم + ١٠ مل محلولاً مشبعاً من كلوريد صوديوم في قمع فصل (+ ٥٠ مل ماء في حالة مسحوق اللبن) . رشح طبقة الكلوروفورم على مخبار وسجل حجمها.

تجرى تنقية هذا المستخلص على عمود كروماتوجرافي من السليكاجيل ، ويغسل العمود بمخلوط حمض الخليك / تولوين ٩/١ (٣٠ مل) ثم ١٠ مل هكسان ثم بمخلوط أسيتونيتريل / إيثير / هكسان ٥/٣/٢ مع إهمال الغسول . يغسل أفلاتوكسين M_1 من

العمود بالأسيتون / كلوروفورم ٤/١ (٣٠ مل) ، ويبخر هذا المذيب ، وتذاب متبقياته في كلوروفورم للتبقيع على رقائق الكروماتوجرافي ، ويبقع ٠,٠٢٥ ميكروجرام أفلاتوكسين M_1 كمحلول قياسي للمقارنة .

كما يمكن الاستخلاص بالميثانول / ماء (٢٠/٨٠) وينقى المستخلص بالإثير البترولي ثم تنقل أفلاتوكسينات اللبن (M) من الميثانول المائي إلى كلوروفورم وينقى على عمود سليكاچيل ويحصل على التوكسينات من العمود بمحلول ٣٪ ميثانول في كلوروفورم للفصل والتقدير على رقائق كروماتوجرافي التي تطور في ٥٪ ميثانول في كلوروفورم وتستقطع وتستخلص من الرقائق للقياس الكمي على سبكتروفوتومتر على طول موجة ٣٥٧ نانومتر أو تقارن بصرياً أو بالدنسيتومتر تحت ضوء فوق بنفسجي .

تقدير أفلاتوكسين M في البول :

تقدر في بول الحيوانات النافقة أثر الشك في تسمم بالأفلاتوكسين . فيخلط ٣٠ مل بولا مع ٤٥ مل كحول ميثانول مطلق في قمع فصل ، استخلص ٣ مرات × ٥٥ مل كلوروفورم . اجمع مستخلصات الكلوروفورم ، وبخرها إلي الجفاف ، ثم أذب الرواسب في ٠,٥ مل أسيتونيتريل / بنزين ٩٨/٢ . بقع على رقائق كروماتوجرافي في سليكاچيل بالمقارنة بمحلول قياسي من أفلاتوكسين M .

أفلاتوكسين البيض :

يستخلص الأفلاتوكسين من البيض بالماء والأسيتون ثم الترشيح والترويق بخلات الرصاص وإعادة الترشيح والتنقية بالإيثير البترولي ثم نقل الأفلاتوكسينات إلى كلوروفورم ، ينقى المستخلص الكلوروفورمي على عمود سليكاچيل ويستقبل للتبخير حتى الجفاف ثم تذاب المتبقيات في أقل كمية كلوروفورم لتبقيع رقائق الكروماتوجرافي .

أفلاتوكسين الأنسجة الحيوانية :

تستخلص بالميثانول ثم الكلوروفورم ، تنقى على عمود سليكاچيل ويقاس كميا على رقائق كروماتوجرافي بالفلور دنسيتومتر .

واستخدم فى تقدير الأفلاتوكسينات كذلك الأعمدة القصيرة ورقائق الكروماتوجرافى عالى الأداء HPTLE والطرق المناعية ELISA .

ل ـ الزيارالينون Zearalenone :

يظهر الزيارالنيون تحت الميكروسكوب الفلورسنتى بفلورسنس أزرق لامع فى ميسليوم الفطر، ولتقديره تطحن ٢٠ جم عينة ، وتستخلص بخلات الإيثيل (١٠٠ مل) ٥ دقائق ثم تطرد مركزياً ٥ دقائق ، وينقل الرائق كمياً بالترشيح ، ويتم تجفيفه بالتبخير تحت تفريغ

على ٤٠ْم . تذاب المتبقيات الزيتية في ٥ مل كلوروفورم ، وتضبط PH على ١٣-١٤ بإضافة حوالي ٢,٥ مل صودا كاوية عيارية ، اخلط جيداً ثم اطرد مركزياً لفصل الطبقات. تسحب أكبر كمية ممكنة من الطبقة العليا الرائقة إلى أنبوبة أخرى ، ويضاف إليها ٠,٥ مل حمض فوسفوريك ٠,٦ عياريا ونقط فينولفثالين ، وتعاير حتى زوال اللون بحمض الفوسفوريك حوالي (١,٢٥ مل) . أضف ١ مل كلوروفورم واستحلب واطرد مركزيا . تستخدم طبقة الكلوروفورم الرائقة مباشرة للتحليل الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (HPLC) على عمود كناور ٢٥ سم × ٤,٦ م مليء بمادة بولارية حجم جزئياتها ٧ ميكرومتر، وغسيل العمود بمخلوط كلوروفورم / إيزو أكتان ٢٥/٧٥ ، مضافاً إليه ١,٥ ٪ ميثانول ، وذلك على حرارة الغرفة ، وضغط ٦٠٠ رطل / بوصة مربعة ، والكشف فلورسنتيا على أطوال موجات ٢٧٤ إثارة و ٤٤٥ انبعاث . يمكن إعادة اكتشاف حتى ٧٥٪ من التوكسين بهذه الطريقة ، والحد الأدنى للكشف حوالي ٢ جزء / بليون زيارالينون .

ولتقدير الزيارالينون ونواتج ميتابوليزمة في الدم والبول كروماتوجرافياً طورت طريقة ، وفيها تجمع البلازما أو البول وتجمد على -٢٠ْم لحين التحليل ، يؤخذ ٥ مل من العينة في أنبوبة اختبار مع ٥ مل خلات صوديوم (٠,٢ مولر) للوصول إلى PH ٥,٥ ، ويضاف ٥٠ ميكروليتر بيتا جلوكورونيداز مع السلفاتاز (نوع H-2) وتحضن العينات ١٦ ساعة على ٣٧ْم ، يوقف التفاعل بعد ذلك بإضافة ١ مل حمض فوسفوريك (٣ مولر) ويؤدي هذا التحضين لتحليل الزيارالينون في صورتية المرتبطة وغير المرتبطة . تستخلص العينات مرتين بمقدار ٢٥ مل كلوروفورم ، استقبل المستخلص وبخره حتى الجفاف باستخدام حمام ماء بمقلب تحت تفريغ ، أذب الراسب في ١ مل تولوين وانقله إلى بطرون Cartridge سليكاچيل يغسل بالتولوين ثم يطور بالتولوين / أسيتون (١٢/٨٨) وناتج التطوير يبخر ويذاب المتبقي في كلوروفورم ويستخلص بالصودا الكاوية ٠,١٨ مولر ثم يعادل بحمض الفسفوريك ويعاد استخلاصه بالكلوروفورم ثم يبخر المستخلص ويذاب المتبقى فى الطور المتحرك للكروماتوجرافى السائل ويحقن لعمود الكروماتوجرافى الذى طوره المتحرك من ثانى كلوروميثان مشبع بالماء محتوى ٢٠٪ ١ ـ بروبانول ، باستخدام كاشف فلورسنتى وطول موجة إثارة ٢٣٦ نانومتر وفلتر قطع انبعاث ٤١٨ نانومتر فتصل نسبة المعاد اكتشافه من الزيارالينون ونواتج ميتابوليزمه من بلازما الدم والبول ٨٠ - ٨٩٪ فى مدى ٢ - ١٠ نانوجرام / مل للبلازما و ٨١ - ٩٠٪ فى مدى ١٠ - ٣٠ نانوجرام / مل بول .

م ـ الفوميتوكسين (Vomitoxin (deoxynivalenol :

تطحن ٥٠ جم عينة وتستخلص بالخلط مع ٦٠ مل إيثير بترولى + ٦٠ مل ميثانول /

ماء ٥٥ / ٤٥ لمدة ١٠ دقائق ، ثم يضاف ١٣٧ مل أخرى من مخلوط الميثانول / ماء + ٣ مل محلول خلات رصاص ٢٠٪ فى حمض خليك ، وتخلط ١٠ دقائق أخرى . اطرد مركزياً واستبعد طبقة الإيثير البترولى . رشح المذيب البولارى ونقه مرة أخرى بواسطة ٦٠ مل إيثير بترولى فى قمع فصل ، وأضف للطبقة الباقية ١٥٠ مل كلورفورم . رشح طبقة الكلورفورم المحتوية على ألفوميتوكسين على ٢ جم كبريتات صوديوم لامائية . ركز على ٥٠م تحت تفريغ . تخفف العينة المركزة بمخلوط ميثانول / ماء ٣/٢ (٣ مل) ، ونق على عمود صغير Sep - Pak . جفف المستخلص بالتبخير تحت تفريغ على ٥٠م ، ويعاد الذوبان فى ٦٠ ميكروليتر ميثانول للتنقية على الكروماتوجرافى السائل عالى الأداء (عمود سفير يسورب حجم جزيئاته ٥ ميكرومتر ويغسل بميثانول / ماء ٤٠ / ٦٠ ، تحت ضغط ١٨٠٠ رطل / بوصة مربعة ، على حرارة الغرفة ، على طول موجة امتصاص ٢٢٥ نانومتر) . يؤخذ الخارج من الجهاز لحظة ظهور منحنى ألفوميتوكسين ويجفف تحت تفريغ على ٥٠م ويعاد ذوبانه فى ٠,٥ مل كلورفورم ، وتجفف فى مجفف ، ثم يضاف ١٠ ميكروليتر أسيتونيتريل / TBT _ Tri - Sil ١/٢ لعمل مشتق طيار (بالحفظ فى حمام مائى ١٥ دقيقة على ٥٠م) للحقن فى جهاز كروماتوجرافى غازى للتقدير الكمى .

يمكن اكتشاف ٢٥ — ٣٥ ٪ من التوكسين وذلك لكثرة عمليات التنقية والتى يصاحبها فقد فى التوكسين . والحد الأدنى للكشف عن الفوميتوكسين بهذه الطريقة يبلغ ٢٥ جزءاً فى البليون .

كما قد تم تطوير طريقة للتقدير الكمى باستخدام الأسبكتروفلورميتر بدلاً من الكروماتوجرافى الغازى ، فبعد استخلاص ألفوميتوكسين تتم إذابته فى ميثانول وتفاعله مع الإيثيلين دي أمين في ميثانول ٥٪ في وجود نيترات الزيركونيل ٦٪ في أنبوبة اختبار ، والرج والتسخين على ٤٠م في حمام مائي لمدة ٤٠ دقيقة ، وبعد التبريد على حرارة الغرفة يقاس الفلورسنس لناتج هذا التفاعل على طول موجة إثارة ٣٦٠ نانومتر وانبعاث ٤٥٤ نانومتر ، والفلورسنس ثابت على حرارة الغرفة لمدة ٤ ساعات على الأقل .

ن ــ السم ت٢ :

يطحن ١٠٠ جم من العينة وترج مع ٥٠٠ مل خلات إيثايل لمدة ساعة ويكرر الاستخلاص ٣ مرات ، ثم يرشح المستخلص ويبخر (حتى يتبقى منه الجزء الزيتي) تحت تفريغ على حمام مائي ، تذاب المتبقيات الزيتية في ١٠٠ مل ميثانول ٨٠٪ ، وينزع الدهن بالاستخلاص مرتين بمقدار ٧٥ مل (٢×) من الهكسان . تخفف طبقة الميثانول بمقدار ٦٠ مل ماء ويضبط PH على ٩ بمحلول كربونات صوديوم مشبع ، ثم استخلص مرتين ، كل مرة بمقدار ١٠٠ مل كلوروفورم / خلات إيثايل (٥٠/٥٠) ، ويبخر المستخلص تحت

تفريغ حتى تتبقى طبقة زيتية يتم إذابتها في أقل حجم من التولوين / خلات إيثايل (١/٣) وتنقى على عمود سليكاچيل يغسل التوكسين منه بالتولوين / خلات إيثايل (١/٣) بمقدار ٢٥٠ مل ، ويبخر لأقل حجم وينقل لقنينة دقيقة ويبخر للجفاف ثم يذاب الراسب في ٠,٥ مل خلات إيثايل للتبقيع على رقائق كروماتوجرافي من السليكاچيل وتطور في خلات إيثايل / تولوين (١/٣) ، وتجفف الرقائق هوائيا وتفحص تحت الأشعة فوق البنفسجية طويلة الموجة بعد الرش بحمض الكبريتيك الميثانولي ٣٠٪ والتسخين على ١٢٠°م لمدة ١٥-٢٠ دقيقة . ولهذه الطريقة معدل إعادة اكتشاف في حدود ٥٠٪ بحساسية ٢,٥ جزء / مليون تقريباً .

س ـ الكشف عن سمين من السموم الفطرية :

الكشف عن الساتراتوكسينات (تريكو ثيسينات) Satratoxins G & H :

تستخلص العينة بالميثانول ويبخر المستخلص حتى الجفاف ثم تذاب المتبقيات في ١٠٠ مل ماء مع ٥٠ مل إيثير بترولي ، وتنقل الطبقة المائية (بعد الفصل) إلى عمود XAD_2 ويغسل بالماء ثم يستخلص منه التوكسين بالميثانول الذي يبخر حتى الجفاف ، ثم يذاب المتبقى في كلوريد ميثيلين ثم يطور على عمود سليكا ويحصل منه على التوكسين بكلوريد الميثيلين وخلات الإيثايل (١/١) الذي يبخر حتى الجفاف ثم يذاب المتبقى في كلوريد ميثيلين ويبقع على رقائق سليكاچيل وتطور في كلوريد ميثيلين / أسيتون (٢/٨) لفصل مركبات الساترا توكسينات (ج ، هـ) . وتحلل هذه السموم على الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط بعمود Polygosil 60-D10 C8 ويطور بميثانول / ماء (٣٥/٦٥) .

دي أستوكسي سكيربينول والسم ت٢ Diacetoxyscirpenol & T-2 :

تطحن ٢٥ جم عينة وتستخلص بالخلط مع ٦٠ مل هكسان + ١٠٠ مل كلوروفورم / ماء ٢٠/٨٠ لمدة ٥ دقائق ، ثم تطرد مركزيا ٥ دقائق . يؤخذ ٥٠ مل من الرائق مع ٦٠ مل هكسان أخرى في قمع فصل، وترج للتنقية. الطبقة السفلى يضاف إليها ٣٠مل ماء + محلول كربونات صوديوم ١٪ حتى PH ٩ ، ثم يضاف ١٢٠ مل كلوروفورم وترج . تؤخذ طبقة الكلوروفورم السفلى وترشح على ١جم كبريتات صوديوم لامائية ، وتركز على ٥٠°م ، ويؤخذ ٢ مل منها لينقى على عمود قصير Sep-Pak من السليكا بواسطة ٥ مل كلوروفورم/ هكسان ١/١ ، ويهمل الغسول ويغسل العمود بالكلوروفورم (٨ مل) لجمع التوكسينات. تجفف بالتبخير على ٥٠°م ، ثم يعاد إذابتها في ٢٠ ميكروليتر كلورفورم للفصل الكروماتوجرافي رقيق الطبقات ، والتي تطور في تولوين / حمض خليك / حمض فورميك ١/٣/٦ ، وبعد تجفيفها ترش بحمض كبريتيك ٣٠٪ في ميثانول ، وتسخن ٣ دقائق على ١١٠°م ، وتفحص تحت أشعة فوق بنفسجية (٣٦٦ نانومتر) ، فيكون الحد الأدنى

للكشف ٠,١ جزء / مليون ت٢ و ٠,٢ جزء / مليون دي أستوكسي سكيربينول .

وبالاستخلاص في الميثانول المائي (١/١) ثم ترسيب البروتينات بمحلول كبريتات أمونيوم (٣٠٪) ، وإعادة الاستخلاص بالكلوروفورم ، ثم غسيل الكلوروفورم بهيدروكسيد بوتاسيوم (٠,٠٢ ع) وكلوريد بوتاسيوم (١٪) لإزالة المركبات الحمضية ، ترشح طبقة الكلوروفورم على كبريتات صوديوم لامائية ثم تنقى على عمود سليكاچيل واستخلاص التوكسينين بالإيثيل إيثيد من العمود ويبخر الإيثير ، يشتق من التوكسينين بإذابة الرواسب في بنزين والتفاعل مع هبتافلورو بيوتر يليميدازول في وجود بيكربونات الصوديوم لعمل إسترات للتحليل على الكروماتوجرافي الغازي ، فتعطي هذه الطريقة حد اكتشاف حوالي ١٠٠ نانوجرام من السم ت٢ و ٢٥ نانوجرام من الداي أسيتوكسي اسكيربينول لكل جرام من العينة ، والمعاد اكتشافه ١٠٥ ، ٩٧٪ على الترتيب من التوكسينين .

وطورت طرق أخرى لتقدير التوكسينين الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين بالاستخلاص في ميثانول مائي والتنقية بخلات الرصاص أو كبريتات الزنك أو حمض الفوسفوتنجستيك ثم الاستخلاص في كلوروفورم أو بنزين للتطوير الكروماتوجرافي رقيق الطبقات أو العمودي بحساسية اكتشاف ٤ جزء / بليون أفلاتوكسين و ٢٠-٤٠ جزء / بليون أوكراتوكسين .

ع ـ الكشف عن عدة سموم فطرية :

Methods of Multimycotoxin Detection

لقد تعددت طرق الكشف عن السموم الفردية ، كما تعددت كذلك طرق الكشف عن عدة سموم معاً في طريقة واحدة ، كما تنوعت الطرق باختلاف مواد العلف ، أو السلع الغذائية ، كما تنوعت طبقاً للمذيبات المستعملة في الاستخلاص ، وطرق التنقية سواء بالمذيبات ، أو باستخدام وسائل الفصل الكروماتوجرافي من TLC ، أو LC ، أو أعمدة كروماتوجرافي ، ثم تباينت في وسيلة تقدير التوكسين والتعرف عليه من TLC، Lc أو GCأو أعمدة كروماترجرافي باستخدام اللمبات ذات الأشعة فوق البنفسجية ، أو أجهزة القياس الضوئية مثل TLC - Densitometer ، UV - Detector ، Fluorescence Detector ، Flame Ionizator ، Mass - Spectrophotometer ، وكلها من أجهزة قياس الكثافة الضوئية Spectrophotometers.

ونظراً لصعوبة إجراء التقديرات المختلفة للتوكسينات ، كل على حدة (وذلك لتعدد هذه التوكسينات ، إذ بلغ عددها حوالي ١٠٠٠ توكسين) ، فقد نشر عديد من الطرق كل منها ، أو بعض منها يختص بالكشف عن عدة توكسينات معاً ، لكن كلها اقتصرت على ما لايزيد عن خمسة توكسينات، وكلها اشتركت معاً في الكشف عن الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسينات وإن استحدثت طرقاً لقياس ٩ - ٢٢ سم فطرى باستخدام TLC .

تقدير الأفلاتوكسين (ب١) والأوكراتوكسين (أ) والزيارالينون :

يتم استخلاص الأفلاتوكسينات من العينة بالأسيتونيتريل والماء ثم يستخلص الأوكراتوكسين من الزيارالينون والأفلاتوكسين ب١ بواسطة بيكربونات الصوديوم ، كما يمكن فصلها جميعها بالكلوروفورم والماء ، وبالاستخلاص الكلوروفورمي تضاف الصودا الكاوية (١ ع) لفصل الزيارالينون وأفلاتوكسين ب١ ، ثم تبقع التوكسينات المستخلصة على رقائق كروماتوجرافي وتطور في تولوين / خلات إيثايل / حمض فورميك (١٠/٤٠/٥٠) وتفحص أسفل الأشعة فوق البنفسجية فيمكن اكتشاف ٧١٪ من أفلاتوكسين ب١ ، ٨٧٪ من أوكراتوكسين (أ) و ٨٥٪ من الزيارالينون بدقة ٢ ، ٤٠ ، ٢٠٠ جزء / بليون على الترتيب.

تقدير الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسينات والزيارالينون والاستريجماتوسيستين والباتيولين معًا باستخدام رقائق كروماتوجرافي :

١ ـ استلخص ٥٠جم عينة في دورق مخروطي ذي غطاء بواسطة ١٨٠ مل أسيتونيتريل CH_3CN + ٢٠ مل كلوريد بوتاسيوم (لمنع تكوين مستحلب) ٤٪ . سد الدورق وضعه على هزّاز Shaker ليهتز بشدة لمدة ١٠ دقائق . رشح وانقل ١٠٠ مل من الراشح إلى قمع فصل سعة ٢٥٠ مل . أضف ٥٠ مل إيزوأوكتان (لإزالة الدهون) ، ورج واترك لفصل الطبقات . اسحب الطبقة السفلى إلى قمع فصل آخر ، وكرر إضافة الإيزو أوكتان (٥٠مل) . أهمل طبقة الإيزو أكتان ، ثم أضف ٢٥ مل ماء إلى طبقة الأسيتونيتريل + ٥٠ مل كلوروفورم $CHCl_3$. هز واترك القمع لفصل الطبقات ، ثم اسحب طبقة الكلوروفورم (السفلى) إلى دورق مخروطي، وكرر إضافة الكلوروفورم مرتين أخريين (٢×١٠ مل). بخر الكلوروفورم على حمام مائي ثم انقل الراسب كميا بالكلوروفورم إلى قنينة صغيرة ، وبخر أسفل تيار من النيتروجين . أضف ٢٠٠ ميكروليتر بنزين / أسيتونيتريل (٩٨/٢) ليتكون عندك المستخلص (أ) . هز بشدة للذوبان باستخدام هزاز ميكانيكي ، وإذا لم تذب الرواسب تماماً فاطرد مركزيا لتجنب انسداد السرنجات وإبرها . انقل ١٠٠ ميكروليتر إلى قنينة ثانية ، وخفف إلى ٥٠٠ ميكروليتر بالبنزين / أسيتونيتريل (٩٨/٢) لتكوين المستخلص (ب) ويحفظ لتبقيعه على TLC .

٢ ـ بقع من المستخلص (ب) على رقائق TLC من السيليكاجيل بدون فلورسنس بكميات ٢,٥ ، ٥ ، ١٠ ميكروليتر (مرتان لكل تركيز) ، وضع على حجم من الحجمين (لكل كمية من الثلاث كميات) حجم معلوم من محلول قياسي معلوم التركيز من كل من الأفلاتوكسينات ، والزيارالينون ، والأوكراتوكسينات رقيقة .

بقع من نفس المستخلص (ب) بنفس الطريقة السابقة لكن على رقائق سيليكاچيل بدون فلورسنس مع إضافة محلول قياسي من الأوكراتوكسينات ، والزيارالينون ، والأستريجماتوسيستين ، ⟵ رقيقة II .

رقيقتا سيليكاچيل ذات فلورسنس تبقع كلاهما بمقدار ٥ ميكرولتر محلول قياسي باتيولين ، ١٠ ميكرولتر مستخلص (أ) ⟵ رقيقة III .

٣ ـ تطور الرقيقة I في محلول تطوير بنزين / ميثانول / حامض خليك (١/١/١٨) ، والرقيقة II في هكسان / أسيتون / حامض خليك (١/١/١٨) ، والرقيقتان III في كلوروفورم / حامض خليك / إثير إيثيلي (٣/١/١٧) في الاتجاه الأول ، ثم تجفف الرقيقتان III على ٨٠°م لمدة ٢٠ دقيقة أو تطاير رائحة الخليك ثم تطور في الاتجاه الثاني في كلوروفورم / أسيتون (١/٩) .

٤ ـ افحص الرقائق كلها أسفل الأشعة فوق البنفسجية طويلة وقصيرة الموجة .

الرقيقة الأولى I تظهر تحت طول موجة طويل كل من الأفلاتوكسينات وأوكراتوكسين A وأوكراتوكسين إيثيل إستر A بفلورسنت أزرق ، بينما أوكراتوكسين B وأوكراتوكسين إيثيل إستر B بفلورسنت خافت ، وتحت الموجة القصيرة يظهر الزيارالينون والأوكراتوكسينات بفلورسنت أزرق . والرقيقة الثانية II تحت الموجة القصيرة تظهر الأوكراتوكسين والزيارالينون بفلورسنت أزرق ، والاستريجماتوسيستين بفلورسنت أصفر .

ويظهر الباتيولين على الرقيقة الثالثة III على طول الموجة القصيرة ٢٥٤ نانومتر للأشعة فوق البنفسجية كبقعة غامقة على أرضية فلورسنتية بيضاء . وأمكن بهذا التكنيك اكتشاف حدود دنيا في الأعلاف المختلفة كالتالي (جزء / بليون أي ميكروجرام / كيلو) :

السم الفطري	ذرة	قمح	شعير	شوفان
أفلاتوكسين G,B	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠
أوكراتوكسين B,A	٤٥	٩٠	٩٠	٩٠
إيثيل إثير أوكراتوكسين B,A	٥٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
زيارالينون	٢٠٠	٤٠٠	٥٠٠	٥٠٠
ستريجماتوسيستين	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠
باتيولين	٤٥٠	٤٠٠	٥٠٠	١٠٠٠

تقدير عديد من السموم الفطرية (أفلاتوكسينات ، أوكراتوكسين ، زيارالينون ، السم ت٢) في الحبوب Multi - Mycotoxins :

يؤخذ ٥٠ جم عينة مطحونة في دورق مخروطي سعة ٥٠٠ مل مع ٢٥ مل ماء + ٢٥٠ مل كلوروفورم، رج لمدة ساعة ، رشح ، خذ أول ٥٠ مل راشح كلوروفورم ، وأضف إليها ١٥٠مل هكسان، وضع المخلوط على عمود سليكاچيل ، اغسل العمود بمقدار ١٥٠مل بنزين، اجمع الزيارالينون بغسيل العمود بمقدار ٢٥٠ مل أسيتون / بنزين ٩٥/٥، اجمع السم ت٢ والأفلاتوكسينات بغسيل العمود بمقدار ١٥٠ مل إيثير جاف ، ثم ١٥٠ مل ميثانول / كلوروفورم ٩٧/٣ ، اجمع الأوكراتوكسين بغسيل العمود بمخلوط ٢٥٠ مل حمض خليك ثلجي / بنزين ٩/١ .

ركز كل غسول إلى الجفاف ، ثم أعد إذابة المتبقيات في ٠,٥ مل أسيتو نيتريل / بنزين ٩٨/٢ . بقع السموم الفطرية على رقائق كروماتوجرافي سليكاچيل ، وكذلك بقع محاليل قياسية ، طور الرقائق في كلوروفورم / ميثانول / حمض فورميك ١/٢/٩٧ . افحص الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين تحت موجة طويلة من الأشعة فوق البنفسجية فتظهر بفلورسنت أصفر ، والزيارالينون يظهر بفلورسنت أصفر تحت موجة قصيرة من الأشعة فوق البنفسجية . وبالرش بالإنيزالدهيد (٧٠مل ميثانول + ١٠مل حمض خليك ثلجي + ٥ مل حمض كبريتيك + ٠,٥ مل بارا ـ إنيزالدهيد) والتسخين ١٠ دقائق على ١٣٠°م يظهر الزيارالينون بلون بني برتقالي ، بينما ت٢ يظهر بلون قرنفلي . تعريض الأوكراتوكسين لبخار الأمونيا يظهر فلورسنت أزرق تحت الأشعة فوق البنفسجية .

الكشف عن الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسين والباتيولين والستريجما توسيستين والزيارالينون :

كما يمكن استخلاص العينة بحمض فوسفوريك (٠,١ مولر) وكلوروفورم بالرج نصف ساعة ثم الترشيح على سيليت ويبخر المستخلص في وجود النيتروچين ، ثم تنقى المستخلصات على عمود كروماتوجرافي Sephadex LH-20 ، وتنزع منه التوكسينات بالكلوروفورم / ميثانول (١/٢) ثم تبقع على رقائق الكروماتوجرافي للفصل فيمكن اكتشاف حوالي ٥ جزء / بليون من الأفلاتوكسينات ، ١٠ جزء / بليون أوكراتوكسين أ ، ٥٠ جزء / بليون من الباتيولين ، ١٠ جزء / بليون ستيريجماتوسيستين ، ٣٥ جزء / بليون زيارالينون .

وبالكروماتوجرافي السائل عالي الضغط ذي عمود من Bondapak / C_{18} ووسط متحرك من أسيتونيتريل / ماء / حمض خليك ثلجي (٢/٤٥/٥٥) أمكن فصل ٥ نانوجرام روبراتوكسين ب ، أنانوجرام زيارالينون ، ٠,٤ نانوجرام أوكراتوكسين أ على طول موجة

الكاشف ٢٥٤ نانومتر ، 1 نانوجرام أفلاتوكسين ب١ أو جـ١ على ٣٦٥ نانومتر .

تقدير التريكوثسينات Trichothecenes :

تستخلص ١٠٠ جم عينة مع ٣٠ مل ماء + ٢٥٠ مل خلات إيثيل لمدة ٥ دقائق . رشح المستخلص وجففه . أعد إذابته في ٥٠ مل أسيتونيتريل ، ورجه مع ٥٠ مل إيثير بترولي ، أعد استخلاص طبقة الإيثير البترولي بكمية ٢٥ مل أسيتونيتريل أخرى ، اجمع طبقات الأسيتونيتريل واخلطها مع ١٠٠ مل چل كلوريد حديديك (١٠٠ مل ماء + ١٠ مل محلول ثالث كلوريد حديديك سداسي الماء تركيز ١٥ ٪ مع إضافة ١٤-١٦ مل محلول صودا كاوية ٤ ٪ للوصول بالحموضة إلى ٤,٦) . رشح واجمع المترشح ، واستخلصه بالكلوروفورم (٣ مرات × ٣٠ مل) ، رشح الكلوروفورم على كبريتات صوديوم لامائية ثم جففه ، وأعد إذابته في حجم صغير من خلات الإيثيل للتبقيع على رقائق كروماتوجرافي لتقدير الداي أسيتوكسي سكير بينول ، السم ت٢ ، الفوميتوكسين .

هذا ويمكن استخدام المستخلص النهائى من خلات الإيثيل في اختبار نكرزة الجلد في الحيوانات ، كاختبار بيولوجي للكشف عن التريكوثسينات ، وذلك بحقن حوالي ٥ ميكرولتر خلات في جلد (سبق حلاقته) الجرذ أو الأرانب ، فقد أظهرت الأرانب تسمماً جلديا من جرعة ٠,٠٠٥ أو ٠,٠١ ميكروجرام سم ت٢ في ٢ ميكروليتر خلات إيثيل .

والأدق من رقائق الكروماتوجرافي ، واختبار الجلد في الحيوانات هو تقدير التريكوثسينات على الكروماتوجرافى الغازي ذي الطيف الكتلي Gas Chromatography - Mass Spectra ، إذا كانت حساسية الاختبار البيولوجي (اختبار جنين الدجاج) ١ جزءاً / مليون من كل توكسين ، بينما حساسية الكروماتوجرافي الغازي ١٠ نانوجرام من كل توكسين ، وحساسية الكروماتوجرافي رقيق الطبقات ١٠٠ نانوجرام من كل توكسين .

وعموماً لتقدير التريكوثيسينات يفضل الاستخلاص في الميثانول المائي ، ثم التنقية بالتجزيء (سائل/سائل) ثم على عمود سليكاچيل أو على كروماتوجرافي رقيق الطبقات، كما يتم الكشف عن هذه السموم وتقديرها كميا بوسائل الكروماتوجرافي سواء الغازي أو رقيق الطبقات ، وعموماً حد الكشف للسم ت٢ ، دي أسيتوكسي سكير بينول ، فوميتوكسين ، نيوسولانيول في مدى ٢٥-١٠٠ نانوجرام / جرام .

كما استخدم فى تقدير التريكوثيسينات وسائل HPTLC و GC و FID – GC (إضافة إلى الطرق البيولوجية على أوراق النباتات والكائنات الحية الدقيقة البحرية بظاهرة الإضاءة الحيوية Bioluminescence) .

سموم الفيوزاريوم :

لتقدير ستة سموم من سموم الفيوزاريوم (دي أوكسي نيفالينول ، دي أسيتوكسي سكير بينول ، السم HT-2 ، السم ت٢ ، فيوزارينون X ، زيارالينون) تستخلص بخلات الإيثايل ثم بمخلوط ماء وميثانول ، تخلط المستخلصات وتنقى على عمود كروماتوجرافي من السليكاجيل ، يتم تفاعل المستخلص النقي مع بيس ترى ميثيل سيليل ترى فلوروأسيتاميد لتكوين مشتقات يمكن فصلها وتقديرها كميا على الكروماتوجرافي الغازي بحدود إعادة اكتشاف ٧٠-٨٠٪ من هذه السموم .

ومن السموم الفطرية حديثة الاكتشاف هى **الفيومونيسينات** Fumonisins والتى طورت لتقديرها طرق كيمو طبيعية باستخدام كل من HPLC و TLC وكذلك ELISA . وهذه المجموعة من السموم الفطرية تنال الآن اهتماماً عالمياً لانتشارها على مستوى العالم ومسئوليتها عن مرض مميت فى مختلف أنواع الحيوانات .

والفيومونيسين B نشط بيولوجيا وشبيهاته وتنتجها أنواع الفيوزاريا ، ومنها الفيوزاريوم مونيليفورم والذى كثيرا ما يلوث الذرة كغذاء للإنسان . ويتم فصل الفيومونيسين على Re-versedphase C_{18} . ويسبب الفيومونيسين ورم مخ الخيول وأديما رئوية للخنازير ومسرطن كبديا فى الجرذان ، ويسبب سرطان المرىء فى الإنسان .

ويؤدى التوكسين إلى تثبيط تخليق الإنزيم المسئول عن التخليق الحيوى للسفنجوليبيد ، مما يؤدى إلى تراكم سفنجانين وزيادة نسبة سفنجانين / سفنجوسين Sphinganine / Sphin-gosine فى خلايا كبد الجرذان ، وكذلك فى البلازما والبول والأنسجة لمختلف أنواع الحيوانات المعرضة للتوكسين ، مما دعى لإعتبار هذه النسبة كدليل حيوى حساس لتعرض الإنسان للفيومونيسين . وتقدر السفنجو ليبيدات باستخلاص اللبيدات من الأنسجة وتنقيتها بالتحلل القلوى ثم تكوين مشتقات فلورسنتيه يتم فصلها باستخدام HPLC مع كاشف فلورتسنتى .

أما المونيليفورمين Moniliformin فيستخلص من العينات فى سوكسلت بالميثانول ويقدر على TLC ورش الرقائق بواسطة ن ـ ميثيل بنزتيازولون ـ ٢ ـ هيدروازون (MBTH) فيشتق مركب مونيليفور من لونه طوبى يقدر كميا على ٥١٨ نانومتر ، وكانت هناك علاقة خطية بين تركيز لتوكسين ومساحة ممنحناه ما بين ١٠٠ ـ ٤٠٠ نانو جرام / بقعة ، بحدود اكتشاف حتى ٧٥ نانوجرام / بقعة .

وحمض السيكوبيازونيك Cylopiazonic Acid يقدر كذلك باستخدام TLC والذى فيه تعامل الرقائق مسبقا بالميثانول ، ويتم الاستخلاص بخليط أسيتونيتريل / ٤٪ كلوريد

بوتاسيوم (٢٠/١٨٠) والتطوير للرقائق فى اتجاهين ، والرش بالدى ميثيل أمينو بنز الدهيد، ويقدر الناتج الملون على ٥٤٠ نانوتر ، إذ إن هنالك علاقة خطية بين التركيز والكثافة الضوئية فى مدى ٥٠ ـ ٥٠٠ نانو جرام ، ونسبة المعاد اكتشافه ٧٨ ـ ٩٠ ٪ .

ولتقدير الفوموبسين تعلق العينة فى صودا كاوية مخففة على PH ٨,٥ - ٩ ، وتحفظ ليلة على ٣ - ٥°م . رشح واضبط PH على ٧,٣ - ٧,٥ بحمض Hcl مخففاً ويخفف إلى ١٠٠ مل . خذ ٢٥ مل من المستخلص على عمود بولى ستيرين ويغسل (بعشرة أضعاف حجم العمود المملوء) بالماء المقطر ، للحصول على التوكسين يغسل العمود بنفس الحجم من الميثانول . جفف طبقة الميثانول بالتبخير ثم أذب فى ٠,٢ مل محلول منظم بورات صوديوم PH ٩,٢ ، ويفصل ويقدر على اليكتروفوريسيس ورقى بنفس المحلول المنظم ويجفف الورق (وات مان رقم ٤) على ١٠٠°م ويفحص تحت ضوء UV ٢٥٤ نانومتر ويقارن بمحلول قياسى .

١٤ ـ المبيدات الكلورية العضوية Organochlorine Pesticides :

تؤدي التغذية على أعلاف ملوثة بالمبيدات الحشرية إلى خروج جزء من متبقياتها في اللبن ؛ لذا قد يحتوي اللبن على DDE ، ديلدرين ، BHC ، ميثوكسي كلور ، هبتاكلور أبوكسيد ، DDT ، هكساكلوروبنزين HCB ، TDE وغيرها . ولتقدير هذه المتبقيات من المبيدات عديدة الكلور ثنائية الفينيل PCBs ، والكلورية العضوية في اللبن أو العلف يجرى التالي :

١ ـ استخلاص الدهن والمبيدات من ١٠٠ مل لبن سائل (أو وزنة علف أو عينة تعطي ٣جم دهن) بإضافتها في إناء طرد مركزي سعة ٥٠٠مل + ١٠٠مل كحولا أو ميثانول + ١ جم أوكسالات صوديوم أو بوتاسيوم ، واخلط ثم أضف ٥٠ مل إيثير إيثيلي ، ورج بشدة لمدة دقيقة ، ثم أضف ٥٠ مل إيثير بترولي ، ورج بشدة دقيقة أخرى ، ثم اطرد مركزيا على ١٥٠٠ لفة / دقيقة لمدة ٥ دقائق . انقل طبقة المذيبات إلى قمع فصل سعة لتر يحتوي على ٥٠٠ - ٦٠٠ مل ماء + ٣٠ مل محلول كلوريد صوديوم مشبعا. أعد استخلاص المتبقيات المائية مرتين بمقدار ٥٠ مل مخلوط إيثير إيثيلي وبترولي (١/١) ، واطرد مركزيا . واجمع طبقات المذيبات في قمع الفصل واخلطها بالماء ، ثم استبعد طبقة الماء وأعد غسيل طبقة المذيبات مرتين بالماء ، واستبعد الماء في كل مرة . إذا حدث استحلاب فأضف ٥ مل محلولاً مشبع كلوريد صوديوم. مرر مخلوط المذيبات على عمود (٢×٥سم) من كبريتات صوديوم لامائية ، مع غسيل العمود بكميات من الإيثير البترولي ، وبخر المذيب المتجمع على حمام بخار لتجميع الدهن .

٢ ـ التجزيء مع الأسيتونيتريل Acetonitrile بنقل حوالي ٣ جم من الدهن المستخلص إلى قمع فصل ١٢٥ مل ، ويضاف إليه إيثيربترولي ليصير الحجم ١٥ مل ، ثم يضاف ٣٠ مل أسيتونيتريل مشبع بالإيثير البترولي ، ويرج بشدة لمدة دقيقة ، واترك لفصل الطبقات ، واسحب الأسيتونيتريل إلى قمع فصل يحتوي ٦٥٠ مل ماء + ٤٠ مل محلولاً مشبع كلوريد صوديوم + ١٠٠ مل إيثير بترولي . استخلص طبقة الإيثير البترولي في قمع فصل ١٢٥ مل بالأسيتونيتريل (٣ مرات × ٣٠ مل) المشبع بالإيثير البترولي ، ورج بشدة دقيقة كل مرة . اجمع المستخلصات في قمع فصل سعة لتر مع وضعه أفقيا ويخلط كل ٣٠ ثانية . اترك لفصل الطبقات ثم اسحب الطبقة المائية إلى قمع فصل آخر سعة لتر . أضف ١٠٠ مل إيثير بترولي إلى القمع الثاني ، ورج بشدة ١٥ ثانية ، واترك لفصل الطبقات . أهمل الطبقة المائية ، واجمع طبقة الإيثير البترولي مع الإيثير البترولي في القمع الأصلي واغسل بالماء (٢ مرة × ١٠٠ مل) . اهمل الغسيل واسحب طبقة الإيثير البترولي على عمود (٢× ٥ سم) من كبريتات صوديوم لامائية إلى دورق وبخر للتركيز .

٣ ـ التنقية على عمود فلوريسيل Florisil قطر ٢ سم وطول ١٠ سم من الفلوريسيل المنشط يعلوه ١سم كبريتات صوديوم لامائية . يبلل العمود أولا بالإيثير البترولي (٤٠–٥٠ مل). انقل مركز الإيثير البترولي إلى العمود ، مع غسيل الدورق مرتين × ٥ مل إيثير بترولي ، وضعها على العمود ، واغسل العمود بمذيب ٦٪ (٢٠٠ مل) ، واجمع الغسول ثم اغسل بمذيب ١٥٪ (٢٠٠ مل) ، واجمع الغسول في قابلة أخرى . ركز كل غسول . يحتوي الغسول الأول على الألدرين ، BHC ، DDE ، TDE (DDD) ، DDT، هبتاكلور ، هبتاكلور أبوكسيد ، ليندان ، ميثوكسي كلور ، PCBs وهو مناسب للكروماتوجرافي . والغسول الثاني يحتوي ديلدرين ، أندرين .

قد يحتاج إلى التنقية مرة أخرى على عمود آخر من الفلوريسيل أو أكسيد الماغنسيوم أو بالتصبن .

٤ ـ التقدير يجرى على وسائل كروماتوجرافية ، مثل الكروماتوجرافي الغازي أو رقيق الطبقات . فمن ناتج تنقية ٣ جم دهن تذاب في ٥ مل محلول يحقن منها ٥ ميكروليتر للجهاز ، فهي تعادل ٣ مجم من عينة الدهن . ويستخدم عمود من OV-101 (DC-200) ، أو خليط من OV-210 + OV-101 لفصل ليندان ، هبتاكلور ، الدرين ، هبتاكلور أبوكسيد، ديلدرين، أندرين ، DDT على الكروماتوجرافي الغازي ، والعمود ١,٨م × ٤ م، ويعمل على حرارة ٢٠٠°م ، بمعدل تدفق ١٢٠ مل / دقيقة ، وحرارة الحقن ٢٢٥°م .

وقد تفصل المبيدات على كروماتوجرافي رقيق الطبقات ، وفي كلا الجهازين تقارن العينة بمحاليل قياسية من المبيدات ، لحساب تركيز المبيدات في العينات بمعلومية ارتفاع أو

مساحة المنحنيات الممثلة لتركيز المبيد في العينة وفي المحلول القياسي .

يلاحظ :

١ ـ الأسيتونيتريل المشبع بالإيثير البترولي يحضر بتشبيع الأسيتونيتريل النقي بالإيثير البترولي المقطر .

٢ ـ مذيب ٦ ٪ مكون من ٦٠ مل إيثير إيثيلى مخفف إلى لتر بالإيثير البترولي معاد تقطيره .

٣ ـ مذيب ١٥ ٪ مكون من تخفيف ١٥٠ مل إيثير إيثيلى إلى لتر بالإيثير البترولي معاد تقطيره .

٤ ـ الإيثير الإيثيلي يعاد تقطيره على ٣٤-٣٥°م ، ويخزن تحت نيتروجين ، ويجب أن يحتوي ٢ ٪ كحول إيثايل .

٥ ـ الفلوريسيل ينشط على ٦٥٠°م ، ويخزن في زجاجات محكمة الغلق في ظلام . سخن ٥ ساعات على الأقل على ١٣٠°م قبل الاستخدام ، ويخزن على ١٣٠°م في زجاجات، أو في مجففات على حرارة الغرفة ، وأعد تسخينه على ١٣٠°م بعد يومين .

وهناك كثير من المراجع التى يمكن الرجوع إليها فى هذا الشأن ومن بينها :

- Adelhamid , A. M . (1981) Diss. Univ . F. Boku ., Wien.
- Amend , Von R. & Muller , H.- H. (1984) Land. Wirtschaftiche Forschung Sep , S. 606 .
- Anon . (1979) Technical Reports Series No. 193 , International Atomic Energy Agency , Vienna .
- AOAC(1975)Natural Poisons . Aoac , 462. - Balzer, I. et al (1978) J . AOAC , 16 : 854 .
- Bata A.et al . (1983) J.AOAC , 66 : 577 .
- Baxter , J.A et al (1985) Bull . Environ Contam . Taxicol , 34 : 645.
- Brown , N.L. et al . (1973) J . AOAC , 56 : 1437 .
- Burns , R.E (1971) Agron . J, 63: 511 .
- Davis , N.D. et al . (1980) J. AOCA , 57 : 109.

- Diaga Yete , M. (1980) Landwirtsch. Forsch ., 37 : 416 .
- Ehnert , M . et al . (1981) Z . Lebensm . Unters Forsch , 172 : 110 .
- Elmer, H.M. (1978) Standard Methods for the Examination of Dairy Products 014 th Ed American Public Health Association Washington D c .
- Engstrom , G. W. et al . (1977) Agric . Food Chem ., 25 : 833 .
- Eppley , R.M. (1968) J. AOCS. 51 : 74 .
- Eppley , R.M. (1979) J.AOCS , Sept ., 824 .
- Fremy, J.M. et al . (1990) Abst . Book of Int . Symp . & Workshep on Food Contamination - Mycotoxins & phycotoxins Cairo .
- Garner , R.C (1975) J . Chromatography , 103 : 186 .
- Gilbert , J. (1990) Abst Book of Int . Symp . & Workshop on Food Contamination - Mycotoxins & Phycotoxins . Cairo .
- Haddon , W.F. et al (1977) J . AOAC , 60: 107 .
- Hald , B . & Krogh, P. (1975) J. AOAC , 58 : 156 .
- Hanssen , E. & Waibel , J. (1978) Alimenta, 17:139 .
- Harrach , B. & Bata, A . (1982) Symp . on Mycotoxins & phycotoxins , Vienna .
- Holaday , C.E. (1976) J. AOCS , 35 : 603 .
- Hostettmann , K. et al (1978 & 1979) Helvetica Chimica Acta , 61:1990 & 62 : 2079 .
- Hostett manm , K . et al .(1979) J. Chromatography , 170 :355 .
- Hsieh, D.p.H et al . (1976) J . Chromatography , 117: 474 .
- Jackson , l..k & Ciegler, A. (1975) Acta Alimentaria Polonica , I (xxv) : 207 .
- Janicki , J. et al . (1975) Acta Alimentaria Polonica , I (xxv) : 207.
- Janicki, J. et al. (1979) Appl . Environ . Microbiol., 36 : 408 .
- Jansen , C. & Dose , k . (1984) Fres . Z. Anal Chem . 318 : 60 .
- Karlsson , E.M. & Chen P.N (1976) J. Chromatage 0.55 : 218.
- Kingston , D.G.I. & Chen , P.N (1976) J . Chromator . 118:414
- Kmieciak , S. (1976) Z. Lebensm . Unters Forsch ., 21:164 .
- Knapsteil, H. (1968) Landwirtsch. Forsch., 160 : 321 .
- Letutour B et al . (1983) J . AOCS , 60:835 .

- Leuenberger , U et al (1978) J . Chromategr , 161 : 303 .

- Marti,L et al . (1978) J . AOAC . 61 : 1353 .

- Masri , M.S. et al (1968) J. AOAC , 51 : 594 .

- Mckinney , J. D . (1975) J.AOCS . 52 : 377 A .

- Meyer H. et at (1980) Supplemente zu Vorlesungen and Ubungen in der Tierernahrung 5 Auflage, Sprungmann Verlag, Hannover .

- Minson,D.J. & Lancaster , R.J (1963) N.Z.J . Agric Res , 6: 140 .

-Moller , J.M.(1972) Kraftfutter ,55 : 1.

- Muller H. M et al (1984) Land Wirtsch . Forsch, 37 : 116 .

- Nesheim S . (1973) J . AOAC . 52 : 975 & 56 : 822 .

- Nesheim, S. & Trucksess M.W. (1978) J. AOAC, 61 : 569.

- Nowotny P . et al . (1983) Chem Mikrobiol Technol Lebensm . 8: 24

- Otsuka , H. et al (1977& 1978) Plant Medice , 32:9 & 33:152.

-Panalaks , T.& Scott, P.M.(1977) J. AOAC , 60:583 .

- Park , D.L et al . (1990) Abst Book of Int . Symp . & Work Shop on Food Contamination - Mycotoxins & Phycotoxins Coiro .

- Peterson , R.E. & Ciegler A. (1978) Appl . Environ . Mierobio.36:613

- Pohland , A.E.& Allen , R. (1970) J . AOAC , 53: 686 .

- Pons , Jr . W.A. (1969) J. AOAC , 52 : 61.

- Pons , Jr . W.A. (1976) J. AOAC , 59 : 101.

- Pons, Jr. W. A. & Franz, Jr. A. O. (1977) J. AOAC , 60 : 89 .

- Popken , A.M. & Dose , k (1983) Z . Anal . Chem . 316 :47 .

- Puls, R. & Greenway , J.R . (1975) Can . J . Comp . Med ., 40 :A1.

- Ranftt , K. & Bassler R. (1984) Kraftfutter 6: 212 .

- Rangama,s. (1979) Manual of anadlysis of Fruit and vegetable products . Tata Me Graw - Hill , New Delhi .

- Rao, G. H . R. & Anders M.W (1973) J . Chromatogr . , 84 : 402 .

- Robb , J. & Norval , M . (1983) Appl Environ . Microbiol , 46 :948
- Romer , T. et al . (1978) J. AOAC , 61 : 801 .

- Roy , D . N. & Roa , P . S . (1971) J. Agric. Fd . Chem ., 19 : 257.

- Schuller , P. L.l. et al (1976) J. AOAS, 59:1315 .
- Schweighardt , H et al (1978) Ernahrung , 2 : 1 .
- Schweighardt , H. et al (1978) Z . Tierphysiol . Tierernahrung u Futtermittelkde . 41: 39 .
- Schweighardt , H. et al . (1980) Chromatographia ,13 : 447 .
- Schweighardt,H. et al.(1980) Z. Lebens. Unters .Forsch., 170 :355.
- Scott , P.M (1973) J. AOAC , 56 : 1028 .
- Scott . P.M. & Hand , T.B. (1967) J.AOAC , 50 : 366 .
- Seiber ,J.N. & Hsieh , D.P.H. (1973) J.AOAC . 56 : 827 .
- Seidler , D et al (1984) Fleischwirtsch ., 64 : 1499 .
- Shamon, G.M. & Shotwell , O.L (1976) J.AOAC , 59:963 .
- Sheehan, E.T.et al . (1972) J.Agr. Food Chem ., 20 : 119 .
- Siriwardana , T.M.G & Lafent , P. (1978) Appl . Environ . Microbiol ., 35 : 206 .
- Stack, M.E et al (1976) J.AOAC , 59 : 966 .
- Stahr, H.M. et al (1979) Appl. Spectroscopy , 33 : 294 .
- Stoloff .L. et al (1971) J.AOAC , 54 : 91 .
- Stray , H. (1978) J. AOAC , 61 : 1359 .
- Stubblefield , R.D. (1979) J. AOAC , 62 : 201 .
- Stubblefield , R.D. (1979) J. AOCS , 56 : 800 .
- Stubblefield . R.D. & Shotwell , O.L. (1977) J.AOAC , 60 : 784 .
- Subramanian, T. et al . (1978) J. AOAC , 61 : 581 .
- Sydenham E. & Stockenstrom , S . (1995) Mycotoxins Conf., South Africa (Tygerlery) .
- Shephard , G.S. & Van der Westhuizen , L (1995) Mycotoxins Conf . , South Africa (Tygerberg)
- Thaler , M . (1980) Sonder druck aus Landwirtsch . Forsch ., Sept. .S. 677 .
-Truck sess , M.W. et al . (1977) J. AOAC, 60 : 795 .
- Zimmerli, B. (1977) Mitt. Gebiete Lebe nsm. Hyg., 68 : 36.

الفصل العاشر

تحليل المياه والهوائم النباتية والتربة

أولا : تحليل المياه

تتطلب مياه المزارع السمكية لكثير من التحاليل الروتينية والدورية الضرورية للحكم على جودة المياه وملاءمتها لمعيشة الأسماك . وفيما يلي نعرض لأهم التحاليل المتطلبة في هذا المجال :

١ - المواد الصلبة المعلقة Suspended Solids :

المـواد الصلبة العالقة والمواد الجـزيئية في المياه لهـا أهميـة في الاستزراع السـمكي ، لأنها تتلف خياشيم الأسـماك ، وتتداخـل مع التنفس ، كما ترسب وتغطس الحيـوانات (اللافقاريات أساساً) الدقيقة Benthos ، وتتداخل مع تغذية الكائنات ثنائية الصدفات التي ترشح الغذاء . العكارة العالية التي سببها العوالق الصلبة تخفض كذلك من التمثيل الضوئي Photosynthesis ، فتعيق إنتاج البلانكتون النباتي والنباتات المغمورة . ارتفاع محتوى الماء من العوالق العضوية الصلبة تتطلب أوكسجين بيولوجي ، فتؤدي إلى استنفاذ الأوكسجين Oxygen Depletion .

وللتقـدير ترشح العينة تحت تفريغ خلال ورق ترشيح سابق الوزن ، مثل ورق ترشيح Whatman GF / C ، فزيادة وزن ورق الترشيح بعد تجفيفه لمدة ساعة على ١٠٥°م عبارة عن الجوامد العضوية وغير العضوية في حجم الماء المرشح. والفقد في الوزن بعد الترميد Ignition على ٥٠٠°م لمدة نصف ساعة عبارة عن وزن المادة العضوية .

التقدير :

رقم بقلم جاف Ballpoint Pen مجموعة من ورق الترشيح Whatman GF/C قطر ٤٧م قرب حوافها ، وضعها في فرن على ٥٠°م لمدة ١٢ ساعة ، ثم اغسلها في صنية Tray بماء مقطر، ثم ضعها منفردة على ورق ألمونيوم Aluminium Foil نظيف ، وجففها في فرن ذي هواء ساخن على ١٠٥°م لمدة ساعـة ، ثم انقلهـا بورق الألمونيـوم إلى مـجـفـف يحـتـوي سيليكاچيل جافة ، واتركها تبرد . انقل كل ورقة وزنها بسرعة لأقرب ٠,١ مجم ، واحفظ ورق الترشيح الموزون في أطباق بتري بلاستيك ، مع تناول ورق الترشيح دائماً بملقط مستوى الأطراف Flat - Ended Forceps ولا تتناولها بالأصابع .

ضع ورق الترشيح الموزونة على قمع قطره ٤٧م مثبت على دورق بخنر سعة ١ لتر ورشح حجماً مناسبا من الماء (عادة ٠,٥ - ١ لتر) . يجب تجميع ٢ مجم جوامد على الأقل والتي تجمع عادة من حجم صغير من المياه الملوثة أو مياه المزارع ، لكن تجمع من كميات كبيرة (٢ - ٥ لتر) من مياه البحر أو مياه البحيرات غير الغنية بالغذاء الطبيعي . وصل الدورق بمصدر تفريغ (مضخة سحب مائية أو مضخة تفريغ كهربائية) ثابت ليس أكبر من ٣٥٠ مل زئبقاً (= ٠,٤٧ بار) . اغسل ورقة الترشيح بالماء المقطر مع فصل مصدر التفريغ ؛كي يعم الماء ورقة الترشيح ، ثم وصل التفريغ . أزل ورقة الترشيح بملقط وضعها على ورق ألومنيوم وجففها لمدة ساعة على ١٠٥°م ، ثم ضعها في مجفف وأعد وزنها .

محتوى الجوامد العالقة مجم / لتر = (و٢ - و١) / ح

حيث (و١ ، و٢) هو الوزن الأولي والوزن النهائي (قبل وبعد التجفيف) لورقة الترشيح (مجم) على الترتيب ، (ح) حجم عينة الماء باللتر . ويمكن عمل عينة خاوية كما سبق تماماً من وزن وتجفيف (مع عدم ترشيح عينة) على ورقة الترشيح .

رمد ورقة الترشيح في فرن احتراق على ٥٠٠°م لمدة نصف ساعة ، واسمح لها أن تبرد في مجفف ، وأعد وزنها ، فالنقص في الوزن عبارة عن المادة العضوية الجزيئية في الحجم المرشح أساسا ، بينما محتوى المادة غير العضوية الجزيئية يستنتج بالفرق بين الوزن المرمد ووزن ورقة الترشيح الأصلي . وبشكل عام فإن المادة غير العضوية تزيد عن المادة العضوية .

فهذا الاختبار يمكننا من تقدير المادة العالقة (جوامد عالقة) من وزنتي ورقة الترشيح قبل وبعد الترشيح والتجفيف ، وكذلك المعادن العالقة من وزنتي ورقة الترشيح الجافة والبوتقة بورقة الترشيح بعد الترشيح والتجفيف والحرق .

٢ ـ التلوث بالمجاري :

يستدل على تلويث الماء بالمجاري (المخلفات البشرية والحيوانية) بوجود مجموعة البكتريا المعروفة بالكوليفورم Coliform والتي تتفاعل سلبياً مع صبغة جرام وتشتمل على الايشريشيا كولي ، انتيرو باكتر أروجنوزا ، كلبسيلا نموينا ، سترو باكتر ، والتي تعيش في أمعاء الحيوانات ذات الدم الحار ، وللكشف عن هذه المجموعة يجرى الاختبار التالي :

١ ـ ينقل ١ سم^3 من عينة الماء إلى أنبوبة معقمة تحتوي على ٩ سم ماء مقطراً معقماً أي (التخفيف ١/١٠) ، ومنها يكرر نفس الشيء للحصول على تخفيف ١/١٠٠ ثم ١/١٠٠٠ .

٢ ـ ينقل ١ سم٣ من كل تخفيف إلى أنبوبة تحتوي ١٠ سم٣ دليل سكر عنب (محتوى على ٠,١٦ جم أزرق بروموثيمول + ٦ سم٣ كحول إيثايل ٩٥٪ + ٥ سم ماء مقطراً ويضاف من هذا الكاشف ١ سم٣ / لتر محلول سكر عنب) كما تحتوي أنبوب ديرهام Durham مقلوب .

٣ ـ حضن الأنابيب على ٣٧ْم لمدة ٢٤-٤٨ ساعة .

٤ ـ الأنابيب التي يتكون فيها غاز ك أ٢ (من تحليل البكتريا لسكر العنب) في أنبوب ديرهام المقلوب يكون وسطها حامضياً فيغير لون الكاشف من الأخضر إلى الأصفر .

٥ ـ تعد الكوليفورم ، ويجب أن تكون ٩٥٪ من عينات الماء خالية من الكلوليفورم ، كما يجب ألا يزيد عدد الكوليفورم في العينة الملوثة عن ١٠ كوليفورم / سم٣ .

٣ ـ المنظفات :

منها منظفات سالبة التأين (غالباً تحتوي أيونات صوديوم) ، وأخرى موجبة (غالباً تحتوي كلور أوبروم) ، وثالثة لا تتأين في الوسط المائي ، والمنظفات سالبة التأين هي الأكثر تلويثا للمياه ، وتكون رغاوي وتضر بالكائنات المائية المختلفة ويصل تركيز سلفونات البنزين الألكيلية في مياه صرف المنازل والمجاري حوالي ٨ جزء / مليون ، وهو تركيز مهلك لكثير من أنواع الأسماك والقشريات. ويجرى تقدير تلوث الماء بالمنظفات الصناعية كالتالي:

١ ـ ينقل ١٠٠ مل من عينة الماء إلى قمع فصل ويضاف إليها ٢سم٣ محلول فوق أكسيد هيدروچين (مخفف ١٠/١) و ١٠سم٣ من محلول فوسفات قاعدي (١٠ جم فوسفات صوديوم ثنائية الهيدروچين تذاب في ٧٠٠سم٣ ماء مقطراً ويضبط PH عند ١٠ بالصودا الكاوية ويكمل إلى لتر) .

٢ ـ رج بشدة لمدة ثلاثة دقائق ، ثم اترك القمع ٥ دقائق .

٣ ـ أضف ٥ سم٣ محلولاً أزرق ميثيلين متعادلاً (٠,٣٥ جم أزرق ميثيلين في ٥٠٠سم٣ ماء مقطراً ، وأكمل إلى لتر بالماء) و ٥سم٣ كلوروفورم .

٤ ـ رج دقيقة واترك لفصل الطبقات .

٥ ـ تنقل طبقة الكلوروفورم إلى قمع فصل آخر يحتوي ١١٠سم٣ ماء مقطراً و ٥سم٣ أزرق ميثيلين حامضي (٠,٣٥ جم أزرق ميثيلين في ٥٠٠سم٣ ماء + ٦,٥سم٣ حمض كبريتيك مركزاً ، وأكمل إلى لتر بالماء) .

٦ ـ رج دقيقة ، واترك لفصل الطبقات ، ورشح طبقة الكلوروفورم على قطن .

٧ ـ تقاس شدة الامتصاص على ٦٥٠ نانومتر ضد مقارنة من الكلوروفورم .

٨ - احسب تركيز المنظفات (ملجم / لتر) = $\frac{\text{شدة الامتصاص} \times ١٧٠,٩٥}{\text{حجم العينة}}$

٤ - المشتقات البترولية والمواد القابلة للأكسدة :

أفضل طريقة لتقدير التلوث بالهيدروكربونات للمياه هي الكروماتوجرافي السائل ذو عمود من السليكاچيل المنشطة ، ويجب غسيل جميع الزجاجيات المستخدمة مسبقاً بالبيكروميك (٣٠ جم ثاني كرومات بوتاسيوم في ١٠٠سم٣ ماء مقطراً ، ثم يضاف إليها لتر حمض كبريتيك مركزاً) ثم الماء ، يلين الأسيتون .

وللتقدير يوضع لتر من عينة الماء في قنينة داكنة اللون ، ويضاف إليها ١٠سم٣ من ثلاثي كلورو ثلاثي فلوروإيثان ، تغلق القنينة وترج بشدة لفترة ١٥ دقيقة ، تترك لفصل الطبقات . تؤخذ الطبقة العضوية بسرنجة زجاجية لتبخر وتركز إلى ٢٠٠ ميكروليتر تحت غاز نيتروچين . يحقن ٥٠ ميكروليتر عن هذه العينة في جهاز الكروماتوجرافي السائل ليقاس الامتصاص على طول موجة ٢٥٤ نانومتر ، تقارن مساحة منحنى العينة بمساحة المنحنى الناتج من حقن الجهاز بخمسين ميكروليتر محلول فينانثرين (تحتوي ٤٠٠ نانوجرام) ، فيكون تركيز المواد الهيدروكربونية (نانوجرام / لتر) = $\frac{\text{مساحة منحنى العينة} \times ٤٠٠}{\text{مساحة منحنى محلول الفينانثرين}}$.

وتقدر قيمة برمنجنات البوتاسيوم المستهلكة في عملية أكسدة بعض الملوثات العضوية كمخلفات النبات السليلوزية ومركبات الفينول من مخلفات مصافي البترول وبعض الصناعات ، كذلك تؤكسد البرمنجنات الكربوهيدرات ومركبات الحديدوز (والنتريت والكبريتيت والكلوريدات إلا إذا كان الوسط حامضياً) .

وتقدر قدرة البرمنجنات على الأكسدة باستخدام ١٠٠سم٣ من عينة الماء مع ١٠سم٣ محلول برمنجنات بوتاسيوم ١/١٦ عياري + ١٠سم٣ حمض كبريتيك ٢٥٪ + ٤٠سم٣ ماء خالي التأين وتحضن على ٣٧ْ لمدة ٤ ساعات . يضاف ٥سم٣ محلول يوديد بوتاسيوم ١٠٪ فينطلق اليود من التفاعل مع المتبقي من البرمنجنات ، فيعاير اليود المنطلق بثيوكبريتات صوديوم ٠,٠٢٥ عياري في وجود دليل النشا ، تجرى نفس الخطوات على عينة مقارنة بها ١٤٠سم٣ ماء خالي التأين ، تحسب قيمة البرمنجنات (تركيز المواد المؤكسدة) بالملليجرام/ لتر = $\frac{\text{س} - \text{ص}}{\text{ع}} \times ٢٠٠$.

حيث س = حجم الثيوكبريتات للمقارنة .

ص = حجم الثيوكبريتات للعينة .

ع = حجم عينة الماء .

٥ - تقدير الأوكسچين بالتنقيط بدليل وينكلر Winkler Titration :

تستهلك من الوقت أكثر من طريقة الالكترود ، إلا أنها أدق ، ويمكن استخدامها مع

العينات المحفوظة ، وتعتمد الطريقة على إنتاج راسب أبيض من هيدروكسيد المنجنيز في العينة ، والذي يمتص أي أوكسجين موجود في العينة لتكوين أكسيد منجنيز هيدراتي بني اللون ، وبالتحميض تتحرر أيونات المنجنيز التي تتفاعل مع اليوديد لتحرير اليود بكمية مكافئة للأوكسجين الأصلي ، ويقدر اليود بالتنقيط بالثيوكبريتات . وتصلح هذه الطريقة للماء العذب والمالح على السواء .

الكيماويات :

أ ـ محلول كبريتات منجنيز ٢,٢ مولر (أذب ٢٤٠ جم كبريتات منجنيز رباعي الماء $Mn\ So_4 . 4H_2\ O$ ، أو ١٨٠ جم كبريتات منجنيز أحادي الماء $Mn\ SO_4 . H_2O$ في ماء وخفف إلى ٥٠٠ مل) .

ب ـ دليل وينكلر Winkler's Reagent (محلول يوديد قلوي يتكون بإذابة ٢٠٠ جم هيدروكسيد صوديوم في ٢٨٠ مل ماء مقطراً ، ثم يضاف ٤٥٠ جم يوديد صوديوم NaI ويبرد ثم يخفف إلى ٥٠٠ مل) .

جـ ـ محلول ثيوكبريتات صوديوم ٠,١ مولر (بإذابة ٢٤,٨٢ جم $Na_2S_2O_3 . 5H_2O$ في ماء مقطر ويكمل حتى لتر) .

د ـ دليل نشا (ماء مقطر يغلي حجمه ١٠٠ مل وبالتقليب أضف ١٠ جم نشا مضروبة في ١٠ مل ماء ، ثم برد ورشح واحفظ في ثلاجة) .

هـ ـ حمض كبريتيك تركيز ٥٠٪ (حجم / حجم) .

و ـ محلول يودات بوتاسيوم ٠,١٠٠ مولر (بذوبان ٣,٥٦٧ جم يودات بوتاسيوم KIO_3 في ماء مقطر وأكمل للتر بالضبط) .

ز ـ يوديد بوتاسيوم KI كريستال .

ح ـ حمض كبريتيك ١ مولر (يحتوي ٩٨ جم / لتر) .

وتتم معايرة محلول الثيوكبريتات بتخفيف ١٢٥ مل من محلول (جـ) الثيوكبريتات إلى لتر بالماء المقطر ليعطي تركيز ٠,٠١٢٥ مولر تقريباً ، ويوضع منها في سحاحة Burette سعة ١٠ مل ، ويخفف محلول اليودات القياسي (و) لتركيز ٠,٠١٠٠ مولر بالضبط ، بأخذ ٢٥,٠ مل بالماصة ، وإكمالها إلى ٢٥٠ مل في دورق معياري Volumetric Flask ثم يوضع في دورق مخروطي Conical Flask سعة ٤٠٠ مل حوالي ٢ جم يوديد بوتاسيوم + ١٥٠ مل ماء مقطراً + ٥ مل حمض كبريتيك ١ مولر ، ونقط من دليل النشا ، أضف ١٠,٠ مل محلول يودات قياسي مخفف ونقط بالثيوكبريتات مع الرج الثابت حتى بداية اختفاء اللون الأزرق فيما لايزيد عن دقيقتين .

فيكون تركيز محلول الثيوكبريتات = $\frac{١٠ \times ٠,٠١}{\text{حجم التنقيط بالمليلتر}}$

مع معايرة الثيوكبريتات في كل يوم عمل لعدم ثبات قوة المحلول المخفف .

وفي الحقل يوضع ٠,٥ مل كبريتات منجنيز أسفل سطح العينة بسرنجة أو ماصة Pipette وكذلك ٠,٥ مل دليل وينكلر ، وذلك لكل ١٠٠ مل من العينة عقب جمعها ، وأعد سدادة زجاجة العينات مع عدم حجز الهواء داخل الزجاجة ورج جيداً . فيمكن حفظ العينة بهذه الطريقة عدة أيام وإن كان يفضل غطسها في الماء .

التقدير :

اسمح للراسب بأن يستقر ثم أدخل ١,٠ مل حمض كبريتيك (هـ) ، وأعد السدادة بسرعة دون حجز هواء بزجاجة العينة ، ورج جيداً فيذوب الراسب البني تاركاً لوناً أصفر من اليود الحر . انقل بماصة ٥٠ مل من العينة المعاملة إلى دورق مخروطي ، ونقط بمحلول الثيوكبريتات المخفف ٠,٠١٢٥ مولر حتى يتبقى لون أصفر باهت . أضف نقطاً من دليل النشا ، واستمر في التنقيط حتى بداية اختفاء اللون الأزرق مع سرعة ودقة التقدير حتى تتجنب تطاير اليود .

فيكون كل ١ مل من الثيوكبريتات ٠,٠١٢٥ مولر مكافئاً لمقدار ٠,١ مجم أوكسجين.
أي أن تركيز الأوكسجين في العينة مجم / لتر =

$$= \frac{\text{حجم التنقيط للثيوكبريتات} \times \text{عياريتها المقدرة} \times ١٠٠٠ \times ٠,١}{\text{حجم عينة الماء المنقطة بالثيوكبريتات (٥٠ مل)}}$$

حجم الثيوكبريتات المنقطة × ٢ إذا كانت عيارية الثيوكبريتات المقدرة ٠,٠١٢٥ بالضبط وحجم عينة الماء ٥٠ مل ، أو ٠,٠٢٥ ، ١٠٠ مل على الترتيب .

ولتحويل التركيز بالمليجرام / لتر (جزء / مليون) إلى مل / لتر يضرب التركيز مجم/ لتر في ٠,٦٩٨ ، بينما لتحويل التركيز مل / لتر إلى مجم / لتر يضرب مل / لتر في ١,٤٣ .

ويمكن تحويل تركيز الأوكسجين من مجم / لتر إلى ٪ تشبع من الجدولين التاليين حسب درجة حرارة الماء عند جمع العينة ، وحسب الارتفاع عن سطح البحر .

قيم التشبع بالأوكسجين في الماء العذب عند ضغط قياسي :

درجة الحرارة ٥ م	الأوكسجين جزء/مليون أو مجم / لتر	درجة الحرارة ٥ م	الأوكسجين جزء/مليون أو مجم / لتر	درجة الحرارة ٥ م	الأوكسجين جزء/مليون أو مجم / لتر
صفر	١٤,٦٢				
١	١٤,٢٣	١١	١١,٠٨	٢١	٨,٩٩
٢	١٣,٨٤	١٢	١٠,٨٣	٢٢	٨,٨٣
٣	١٣,٤٨	١٣	١٠,٦٠	٢٣	٨,٦٨
٤	١٣,١٣	١٤	١٠,٣٧	٢٤	٨,٥٣
٥	١٢,٨٠	١٥	١٠,١٥	٢٥	٨,٣٨
٦	١٢,٤٨	١٦	٩,٩٥	٢٦	٨,٢٢
٧	١٢,١٧	١٧	٩,٧٤	٢٧	٨,٠٧
٨	١١,٨٧	١٨	٩,٥٤	٢٨	٧,٩٢
٩	١١,٥٩	١٩	٩,٣٥	٢٩	٧,٧٧
١٠	١١,٣٣	٢٠	٩,١٧	٣٠	٧,٦٣

وتضرب هذه القيمة في معامل من الجدول التالي يتوقف على ارتفاع جسم الماء .

معاملات تصحيح قيم تشبع الأوكسجين طبقاً للارتفاع بالمتر :

	صفر	١٠٠	٢٠٠	٣٠٠	٤٠٠	٥٠٠	٦٠٠	٧٠٠	٨٠٠	٩٠٠
صفر	١,٠٠٠	٠,٩٨٧	٠,٩٧٥	٠,٩٦٣	٠,٩٥١	٠,٩٣٩	٠,٩٢٨	٠,٩١٦	٠,٩٠٤	٠,٨٩٣
١٠٠٠	٠,٨٨٣	٠,٨٧٢	٠,٨٦٢	٠,٨٥١	٠,٨٤١	٠,٨٣٠	٠,٨٢٠	٠,٨٠٩	٠,٨٠٠	٠,٧٩١
٢٠٠٠	٠,٧٨٢	٠,٧٧٢	٠,٧٦٢	٠,٧٥٤	٠,٧٤٥	٠,٧٣٧	٠,٧٢٨	٠,٧١٨	٠,٧٠٩	٠,٧٠١
٣٠٠٠	٠,٦٩٣	٠,٦٨٦	٠,٦٧٨	٠,٦٧٠	٠,٦٦٢	٠,٦٥٤	٠,٦٤٦	٠,٦٣٨	٠,٦٣٢	٠,٦٢٤
٤٠٠٠	٠,٦١٧									

فتكون النسبة المئوية للتشبع في العينة =

محتوى الأوكسجين المسجل / قيمة التشبع عند درجة حرارة وارتفاع معينين .

إن كانت العينة غنية بالمادة العضوية ، فينبغي أكسدة المادة العضوية أولاً بالبروم في الحقل، مع إزالة الزائد من البروم بالمساليسيلات قبل التقدير ، فيضاف في الحقل ٠,٥ مل

محلول بروم (٣جم برومات بوتاسيوم $KBrO_3$ يضاف إليها ٢٠ جم بروميد صوديوم $NaBr$ ثم ٢٥ مل حمض هيدروكلوريك مركزاً ، ويكمل إلى ١٠٠ مل بماء مقطر) ، ويعاد غلق زجاجات العينات بسرعة ، وفي المعمل تغمس زجاجات العينات في ماء في الظلام لمدة ٢٤ ساعة ، ثم يضاف إليها ٠,٥ مل محلول ساليسيلات (ساليسيلات صوديوم ١٠ ٪ وزن / حجم ، تحضر أولاً بأول) ، ورج واترك ١٥ دقيقة ، ثم يجرى عليها الخطوات السابقة من أول إضافة كبريتات المنجنيز ودليل وينكلر إلى نهاية التقدير .

ذائبية الأوكسچين في الماء (مجم / لتر) على درجات حرارة وملوحة مختلفة عند قياسها في ماء معرض لهواء مشبع بالماء على ضغط كلي ٧٦٠م زئبق (= ١,٠١ بار) .

درجة الحرارة ٥م	الملوحة في الألف							
	صفر	٥	١٠	١٥	٢٠	٢٥	٣٠	٣٥
صفر	١٤,٦	١٤,١	١٣,٦	١٣,٢	١٢,٧	١٢,٣	١١,٩	١١,٥
٢	١٣,٨	١٣,٣	١٢,٩	١٢,٥	١٢,١	١١,٦	١١,٣	١٠,٩
٤	١٣,١	١٢,٧	١٢,٢	١١,٨	١١,٥	١١,١	١٠,٧	١٠,٣
٦	١٢,٥	١٢,١	١١,٦	١١,٢٥	١٠,٩	١٠,٥	١٠,٢	٩,٨
٨	١١,٨	١١,٤٥	١١,١	١٠,٧	١٠,٤	١٠,١	٩,٧	٩,٤
١٠	١١,٣	١٠,٩	١٠,٦	١٠,٢	٩,٩	٩,٦	٩,٣	٩,٠
١٢	١٠,٨	١٠,٤٥	١٠,١	٩,٨	٩,٥	٩,٢	٨,٩	٨,٦
١٤	١٠,٣	٩,٩٥	٩,٧	٩,٤	٩,١	٨,٨	٨,٦	٨,٢
١٦	٩,٩	٩,٥٥	٩,٣	٩,٠	٨,٧	٨,٥	٨,٢	٧,٩
١٨	٩,٥	٩,١٥	٨,٩	٨,٦	٨,٤	٨,١	٧,٩	٧,٦
٢٠	٩,١	٨,٨	٨,٦	٨,٣	٨,١	٧,٨	٧,٦	٧,٣
٢٢	٨,٧	٨,٦	٨,٣	٨,١	٧,٩	٧,٧	٧,٥	٧,٢
٢٤	٨,٤	٨,٣	٨,١	٧,٨	٧,٦	٧,٤	٧,١	٦,٩
٢٦	٨,١	٨,٠	٧,٧	٧,٥	٧,٣	٧,١	٦,٨	٦,٦
٢٨	٧,٨	٧,٧	٧,٥	٧,٣	٧,٠	٦,٨	٦,٦	٦,١
٣٠	٧,٦	٧,٤	٧,٢	٧,٠	٦,٨	٦,٦	٦,٤	٦,١
٣٢	٧,٣	٧,٢	٧,٠	٦,٩	٦,٦	٦,٣	٦,١	٥,٩
٣٤	٧,١	٧,٠	٦,٩	٦,٧	٦,٤	٦,٢	٦,٠	٥,٨
٣٦	٦,٩	٦,٨	٦,٧	٦,٥	٦,٢	٦,١	٥,٩	٥,٧
٣٨	٦,٧	٦,٦	٦,٥	٦,٤	٦,١	٥,٩	٥,٧	٥,٦
٤٠	٦,٥	٦,٥	٦,٣	٦,٢	٦,٠	٥,٧	٥,٦	٥,٥

ولتعديل الضغط يضرب في معامل p/ ٧٦٠ حيث p ضغط البارومتر المسجل مم زئبق أو p / ١٠١٠ إذا كان الضغط البارومتري مسجلاً بالملي بار mbar .

٦ ـ المادة العضوية الذائبة والجزيئية

Dissolved and Particulate Organic Matter

تلويث الماء بالمواد العضوية يؤدي إلى تحللها بالبكتريا الهوائية (المستهلكة للأوكسجين الذائب في الماء) مما يخفض أوكسجين الماء فينشط عمل البكتريا اللاهوائية والتي تحلل كذلك المواد العضوية على النحو التالي :

الملوثات	نواتج تحللها بالبكتريا الهوائية	نواتج تحللها بالبكتريا اللاهوائية
مواد عضوية كربونية	ثاني أكسيد كربون	غاز ميثان
مواد عضوية كبريتية	كبريتات	غاز كبريتيد هيدروجين
مواد عضوية نيتروجينية	نترات	أمونيا
مواد عضوية مفسفرة	فوسفات وأرثوفوسفات	

أ ـ استهلاك الأوكسجين الكيماوي الحيوي :

Biochemical Oxygen Demand (B. O. D)

اختبار قياسي معملي ، كمقياس لخواص استهلاك الأوكسجين النسبية للماء . ويجرى لاختبار مقدار تلوث عينة الماء ، حيث إن استهلاك الأوكسجين في عينة ما : يرتبط نسبياً بالنشاط البكتيري ، أي بعدد البكتريا وبكمية المادة العضوية وبالطحالب والبلانكتون الحيواني الموجود في الماء الطبيعي غير المرشح . فمقارنة تركيز الأوكسجين في البداية وبعد تحضين لمدة ٥ أيام على درجة حرارة ثابتة (عادة ٢٠°م) لعينة مخففة من ماء صرف تعطي مقياسا لقوة الصرف والقدرة على التلويث Polluting .

التقدير :

تؤخذ ٣ عينات في أواني زجاجية سعة ٢٥٠ – ٣٠٠ مل ، ويقدر الأوكسجين الذائب (كما سبق ذكره) في إحدى العينات ثم يحكم غلق الأخيرتين ، وتوضعان في حضان في الظلام لمدة ٥ أيام ، بعدها يقدر فيهما الأوكسجين الذائب بالتنقيط عادي . في العينات الملوثة جدا قد ينخفض الأوكسجين إلى صفر قبل مضي مدة الخمسة أيام ، ففي هذه الحالة من الضروري خفض كمية المادة القابلة للأكسدة في الآنية وتزودها بالأوكسجين ، وذلك عن طريق التخفيف للعينة بكمية معلومة من ماء مشبع بالهواء نقي كما يلي :

المصدر	التخفيف
فضلات صناعية قوية	١ / ١٠٠٠ - ١ / ١٠٠
مجاري خام ومرسبة	١ / ١٠٠ - ١ / ٢٠
مياه مؤكسدة (مثلا من مزارع أسماك)	١ / ٢٠ - ١ / ٤
مياه أنهار وأحواض سمك	١ / ٤ - بدون تخفيف

وينبغي في ماء التخفيف أن يضاف إلى كل لتر منه ١ مل من كل من محلول منظم فوسفات ، كبريتات ماغنسيوم ٠,٠٩١ مولر (٢٢,٥ جم $Mg\ SO_4 . 7H_20$ في لتر) ، كلوريد كالسيوم ٠,٢٤٨ مولر (٢٧,٥ جم $Ca\ Cl_2$ لامائي في لتر) ، كلوريد حديديك ٠,٩٢ × ١٠^-٣^ مولر (٠,٢٥ جم $Fe\ Cl_3 . 6H_2O$ في لتر) . ويحتوي محلول منظم فوسفات على ٨,٥جم $KH_2\ PO_4$ + ٢١,٧٥ $K_2H\ PO_4$ + ٣٣,٤جم $Na_2\ H\ PO_4 . 7H_2O$ + ١,٧ جم $NH_4\ Cl$ في لتر ماء مقطر ، ويحضر من جديد كلما لوحظ نمو بيولوچي فيه . ويقدر الأوكسچين الذائب في ماء التخفيف قبل وبعد التحضين كذلك .

أمثلة للحساب :

أوكسچين ذائب أولي = ٨,٣ مجم / لتر .

أوكسچين ذائب نهائي (بعد ٥ أيام تحضين) ٣,٧ مجم / لتر .

.. الانخفاض في الأوكسچين الذائب = ٤,٦ مجم / لتر=

الأوكسيچين المطلوب كيماوي حيويا .B.O.D .

أما إذا كانت العينة مخففة بنسبة ١ : ١٠ ، وكان :

الأوكسچين الذائب أولي = ٨,٣ مجم / لتر .

الأوكسچين الذائب نهائي = ٣,٧ مجم / لتر .

.. الانخفاض في الأوكسچين الذائب = ٤,٦ مجم / لتر .

وكان الأوكسچين الذائب الأولي في ماء التخفيف = ٨,٤ مجم / لتر .

الأوكسچين الذائب النهائي في ماء التخفيف = ٨,٢ مجم / لتر .

.. الانخفاض في الأوكسچين الذائب لماء التخفيف = ٠,٢ مجم / لتر .

وعليه ، فالانخفاض الراجع للعينة = ٤,٦ - ٠,٢ = ٤,٤ مجم / لتر .

ولما كان التخفيف ١٠/١ .

.. الأوكسچين المطلوب حيويا (بيوكيماويا) .B.O.D = ٤,٤ × ١٠ = ٤٤ مجم/لتر.

ولقد قسمت الأنهار من حيث هذا المقياس للآتي :

الحالة الملحوظة لمجرى النهر	الأوكسجين المطلوب حيوياً في ٥ أيام
نظيف جداً	أقل من ١
نظيف	٢
نظيف لحد ما	٣
مشكوك في نظافته	٥
ردىء	أكثر من ١٠

وهذا الاختبار هام لمزارع الأسماك ، إذ يمكن مزارع السمك Fish Farmer من اختبار جودة الماء الداخلة إلى مزرعته ، والمياه في مزرعته للتحكم في تغييرها ، والوقوف على كفاءة المعاملات المختلفة ، مع ملاحظة أن استهلاك الأوكسجين في ظروف الحقل تتأثر بدرجة الحرارة وضوء الشمس وحركة الماء وغيرها .

ب ـ استهلاك الأوكسجين كيماويا (Chemical Oxygen Demand (C.O.D.) :

مقياس لوجود المادة العضوية القابلة للأكسدة في العينة ، ويختلف عن B.O.D في تقديره ، إذ يقدر كيماوياً باستخدام مواد مؤكسدة قوية ، وتتقارب قيمة C.O.D مع B.O.D إذا لم تحتو العينة على مخلفات سامة. وتمتاز C.O.D بسرعة تقديرها إذ لا تتطلب تحضين .

الكيماويات :

١ ـ محلول برمنجنات بوتاسيوم $\frac{١}{٨٠}$ مولر يحضر بتخفيف محلول $\frac{١}{١٠}$ مولر المحتوي على ٣,١٦١ جم $KMnO_4$ / لتر . يحتوي كل ١ مل منه على ٠,١ مجم أوكسچين .

٢ ـ محلول ثيوسلفات صوديوم $\frac{١}{٨٠}$ مولر تقريبا يحضر من محلول $\frac{١}{١٠}$ مولر بتخفيف ١٢٥ مل منه إلى لتر قبل الاستخدام .

٣ ـ يوديد بوتاسيوم ٥٠ جم في لتر ماء مقطر .

٤ ـ محلول نشا (كما سبق في تقدير الأوكسجين الذائب) .

٥ ـ حمض كبريتيك ٢٥٪ حجم / حجم .

التقدير :

أضف ١٠,٠ مل محلول برمنجنات إلى ١٠٠ مل عينة في دورق ٢٥٠ مل ثم أضف ١٠مل حمض كبريتيك ٢٥٪. وللمقارنة Control أضف نفس المحاليل لمقدار ١٠٠ مل من ماء مقطر مرتين. ثم ضع العينات والمقارنة في حمام مائي يغلي لمدة ٣٠ دقيقة، ثم ارفع وبرد وأضف ١مل محلول يوديد ورج ، ثم نقط اليود المتحرر بمحلول ثيوكبريتات (بواسطة

سحاحة ١٠ مل) ، مع استخدام دليل النشا حتى نقطة النهاية ، كما في تقدير الأوكسجين الذائب .

الحساب :

إذا كان حجم الثيوكبريتات المستخدمة في التنقيط للمقارنة = ح١ والحجم المماثل المستخدم للعينة = ح٢ .

فإن الأوكسجين الممتص في العينة مجم / لتر = $\frac{١٠ \, (ح_١ - ح_٢)}{ح_١}$.

٧ ـ ثاني أوكسيد الكربون :

تقدير ثاني أوكسيد الكربون الحر والكلي :

Free and Total Carbon Dioxide

أ ـ ثاني أوكسيد الكربون الحر :

يرجع ذلك إلى تركيز ثاني أوكسيد الكربون وحمض الكربونيك H_2CO_3 ، وإن كان الأخير يشكل نسبة بسيطة . وثاني أوكسيد الكربون الحر يشكل مشكلة للأسماك في تكوين حصوات الكلى Nephrocalcinosis . ويقدر ثاني أوكسيد الكربون الحر بالتنقيط بمحلول قلوي قياسي خالي الكربونات حتى تركيز أيون هيدروجين PH ٨,٣ ، أو نقطة تحويل لون دليل الفينولفثالين ، وعليه فالماء ذو PH أعلى من ٨,٣ لا يحتوى ثاني أوكسيد كربون حر للتنقيط ، بل يحتوي كربونات وبيكربونات .

الكيماويات :

أ ـ هيدروكسيد صوديوم ٠,٠١ مولر خالي الكربونات (يذاب ٥٠ جم صودا كاوية نقية في ٥٠ مل ماء ويرشح لإزالة كربونات الصوديوم ، ويحفظ في إناء سميك من البولي بروبيليه ، أو البولي إيثين ثم يخفف إلى القوة المطلوبة بماء مقطر خال من ثاني أوكسيد الكربون بالغليان ١٠ دقائق والمعايرة ضد حامض هيدروكلوريك ٠,٠١ مولر) .

ب ـ دليل فينولفثالين (أذب ٠,٥ جم فينولفثالين في ٥٠ مل من كحول إيثايل ٩٥٪ ثم أضف ٥٠ مل ماء) .

التقدير :

ضع القلوي القياسي في الإناء الاحتياطي للسحاحة ذات الصنبور ذي الاتجاهين اسحب ١٠٠ مل عينة ماء إلى دورق مخروطي وأضف بضع نقط من دليل فينولفثالين ، ونقط بالقلوي حتى يتحول لون الماء إلى البنفسجي الفاتح .

تركيز ثاني أوكسيد الكربون الحر بالميكرومول / لتر =

$\frac{\text{حجم القلوي المنقط} \times \text{تركيزه المولاري} \times ١٠٠٠}{\text{حجم العينة (١٠٠ مل)}}$ = حجم القلوي المنقط×تركيز المولاري×١٠ .

والتركيز بالمليجرام / لتر = التركيز بالميكرومول / لتر × ٠,٠٤٤ .

ولتحويل التركيز من جزء / مليون (مجم / لتر) إلى مل / لتر يضرب الأول في ٠,٥٠٦ ، بينما لتحويل التركيز من مل / لتر إلى جزء / مليون فيضرب الأول في ١,٩٨ .

ب ـ ثاني أوكسيد الكربون الكلي :

يشير ذلك إلى كل صور ثاني أوكسيد الكربون غير العضوي ، أي ثاني أوكسيد الكربون وحمض الكربونيك والبيكربونات والكربونات . ويمكن تقديره أولا بتحويل كل الصور إلى بيكربونات ، بإضافة حمض مخفف أو قلوي مخفف (حسب تركيز أيون الهيدروجين في العينة) إلى PH ٨,٣ ، ثم يقدر كما سبق عاليه في ثاني أوكسيد الكربون الحر ، لكن باستخدام حمض هيدروكلوريك ٠,٠١٠٠ مولر ، إذا أعطى عينة الماء لونا بنفسجيا عند إضافة دليل الفينولفثالين . وأخيرا تقدر البيكربونات بالتنقيط بحمض هيدروكلوريك ٠,٠١٠٠ مولر إلى PH ٤,٥ باستخدام دليل أحمر الميثيل / أخضر البروموكريزول .

الكيماويات :

أ ـ حمض هيدروكلوريك ٠,٠١ مولر (عياري) يحضر بتخفيف ٢٥ مل حمض مركز إلى ٣ لتر بالماء المقطر ليعطي ٠,١ مولر ، ثم يخفف ثانية ٥٠ مل منه إلى ٥٠٠ مل (أو ١٠٠ مل إلى لتر) ليعطي تركيز ٠,٠١ مولر ، مع معايرته بمحلول طازج من الكربونات تركيز ٠,٠١٠٠ مولر (٠,٠٢٠٠ عياري) بإضافة ١,٠٥٩ جم كربونات صوديوم نقية خالية الماء Na_2CO_3 مجففة ليلة على ١١٠°م في ماء مقطر ويكمل إلى لتر .

ب ـ الدليل ، ويحضر بإذابة ٠,٠٢ جم أحمر ميثيل مع ٠,٠٨ جم أخضر بروموكريزول في ١٠ مل كحول إيثايل ٩٥٪ متعادل .

حساب التركيز لثاني أوكسيد الكربون الكلي بالمليمول / لتر =

$$\frac{\text{حجم الحامض المستهلك في التنقيط لخفض PH من ٨,٣ إلى ٤,٣ (مل)} \times \text{تركيز الحامض المولاري} \times ١٠٠٠}{\text{حجم العينة الماء (مل)}}$$

ولتحويل التركيز إلى مجم / لتر يضرب في ٠,٠٤٤ ولعدم دقة الوصول لنقطة الدليل خاصة الفينولفثالين ، فيفضل استخدام جهاز PH ، للتحكم في كمية الحامض المستخدمة لخفض الـ PH من ٨,٣ إلى ٤,٣ .

وهناك جداول ومعادلات لحساب ثاني أوكسيد الكربون الحر والكلي في ماء البحر .

٨ ـ الحموضة Acidity :

ترجع حموضة الماء لوجود ك أ٢ غير مرتبط ، أو أحماض معدنية ، وأملاح أحماض

قوية وقواعد ضعيفة . وتقدر حموضة الماء بالمعايرة بقلوي قوي في وجود دليل برتقالي الميثيل (حموضة حرة) والتي ترجع لوجود أحماض معدنية ، بينما استخدام دليل الفينولفثالين في المعايرة للحموضة الكلية ، والتي ترجع لوجود أحماض ضعيفة وأملاح الأحماض ولبعض التحلل المائي .

وللتقدير للحموضة الكلية ينبغي أن تكون العينة طازجة عقب جمعها مباشرة في أوان ذات سدادات لمنع تسرب ك أ٢ . فيؤخذ حجم من العينة في دورق مخروطي + ٣ نقط دليل فينولفثالين ، وتعاير على سطح أبيض بصودا كاوية ٠,٠٢ عياري حتى ظهور لون قرنفلي باهت .

الحموضة الكلية مجم / لتر كربونات كالسيوم =

$$\frac{\text{حجم الصودا الكاوية} \times \text{عيارية الصودا الكاوية} \times ٥٠ \times ١٠٠٠}{\text{حجم العينة (مل)}}$$

٩ ـ القلوية Alkalinity :

أ ـ القلوية الكلية Total Alkalinity :

عبارة عن التركيز المجمع للأنيونات للأحماض الضعيفة، أساساً البيكربونات والكربونات، وهي مقياس للقدرة التنظيمية للماء Buffering Capacity أي قدرة الماء لمقاومة تغييرات PH. ووجود أملاح الكربونات والبيكربونات في محاليل تجعلها تتحلل لضعف حمض الكربونيك $H_2 CO_3$ منتجا أيونات هيدروكسيل وعليه تزداد PH .

وقلوية الماء تسببها الكربونات والبيكربونات والهيدروكسيدات الموجودة في الماء ، وتقدر بالمعايرة بمحلول قياسي من حمض معدني قوي . ويستخدم دليل الفينولفثالين لتقدير القلوية التي مرجعها الهيدروكسيدات والكربونات ، وبرتقالي الميثيل لتقدير القلوية الراجعة للبيكربونات .

قلوية الفينولفثالين تقدر في عينة بإضافة ٠,١ مل فينولفثالين والمعايرة على سطح أبيض بحمض كبريتيك ٠,٠٢ عياري حتى يختفي اللون القرنفلي .

قلوية الفينولفثالين مجم / لتر كربونات كالسيوم =

$$\frac{\text{حجم الحامض} \times \text{عيارية الحامض} \times ٥٠ \times ١٠٠٠}{\text{حجم العينة (مل)}}$$

قلوية برتقالي الميثيل تقدر بإضافة ٠,١ مل دليل برتقالي ميثيل إلى العينة السابقة بعد تقدير قلوية الفينولفثالين فيها ، ثم تعاير ثانية بحمض كبريتيك ٠,٠٢ عياري حتى يتحول لونها من الأصفر إلى البرتقالي الخافت .

فتكون القلوية الكلية مجم / لتر كربونات كالسيوم =

$$\frac{\text{(حجم الحامض المستهلك في معايرة قلوية الفينولفثالين + حجم الحامض المستهلك في معايرة برتقالي الميثيل)}}{\text{حجم العينة (مل)}}$$

× عيارية الحامض × ٥٠ × ١٠٠٠

إذا كانت قلوية الفينولفثالين ليست صفراً لكنها أقل من القلوية الكلية فتكون القلوية راجعة للكربونات ، وإذا زادت قلوية الفينولفثالين عن نصف القلوية الكلية فتكون القلوية راجعة لوجود هيدروكسيدات ، وإذا قلت قلوية الفينولفثالين عن نصف القلوية الكلية . فترجع القلوية في هذه الحالة لوجود البيكربونات .

ويقدر تركيز البيكربونات بالتنقيط بحمض قوي قياسي إلى PH ٤,٥ لإزالة كل مجاميع الهيدروكسيل ، فيتواجد حمض الكربونيك عند هذه النقطة غير منحل ، أو في صورة ثاني أوكسيد كربون . وفي الحقيقة فإن الحامض المستخدم في التنقيط يعكس مجموع كل الأنيونات (الأيونات السالبة) الضعيفة بجانب البيكربونات (كالسليكات والبورات والهيدروكسيل والكربونات) في المياه القلوية ، بينما في المياه الحامضية القوية يكون مجموع الأنيونات الضعيفة سالبا تعبيرا للحموضة الموجبة .

الكيماويات :

أ ـ حمض هيدروكلوريك ٠,٠١ مولر (= ٠,٠١ عياري) .

ب ـ كربونات صوديوم قياسي ٠,٠١٠٠ مولر (= ٠,٠٢٠٠ عياري) .

جـ ـ دليل أحمر ميثيل / أخضر بروموكريزول .

التقدير : يمكن حفظ العينات لعدة أسابيع في أواني محكمة الغلق سواء زجاجا أو بلاستكا.

انقل بماصة ٢٥,٠ – ١٠٠,٠ مل من عينة الماء إلى دورق مخروطي ثم أضف ١–٥ نقط من الدليل سابق التحضير (جـ) ، ثم نقط بحمض الهيدروكلوريك القياسي (أ) من سحاحة سعة ١٠ مل مع الرج المستمر حتى يتغير اللون من الأزرق إلى البنفسجي الشاحب، أو استعمل جهاز PH حتى تبلغ PH ٤,٥ .

الحساب :

إذا كانت عيارية الحامض (ع) ، حجم الحامض المستهلك في التنقيط ($ح_٢$) مل ، وحجم العينة ($ح_١$) ، فإن القلوية بالمليمكافئ في اللتر = $\frac{ع \times ح_٢ \times ١٠٠٠}{ح_١}$

القلوية الكلية في ماء البحر لا تقدر بهذه الطريقة البسيطة المباشرة ، وذلك لاحتواء ماء البحر على تركيزات عالية من أيونات سالبة (أنيونات) عديدة ؛ لذلك تقدر القلوية الكلية

في ماء البحر بعد إضافة حجم معين من حامض قياسي ثم تحسب القلوية من عدة جداول حسب درجة الحرارة PH ، الملوحة للماء . وإذا استخدم دليل الفينولفثالين (بدلاً من أحمر الميثيل / أخضر بروموكريزول) إلى نقطة تعادل عند PH ٨,٣ ، وباستخدام نفس طريقة الحساب السابقة . فإنها تقدر قلوية الفينولفثالين Phenolphthalein Alkalinity ، والتي تعبر عن تركيز أيونات الهيدروكسيل والكربونات فقط .

بينما قلوية الكربونات تعني تركيز أيونات الكربونات والبيكربونات ، ويمكن حسابها من القلوية الكلية باستخدام معامل تحويل من جداول خاصة .

وتركيز ثاني أوكسيد الكربون الكلي (أي كل صور ثاني أوكسيد الكربون غير العضوي) يمكن حسابها من قلوية الكربونات والتوصيل الكهربي للعينة باستخدام معاملات تحويل معينة من جداول خاصة .

ب ـ قلوية برتقالي الميثيل للماء

: Methyl Orange AlkalinityIn Water

قلوية الماء تعني كل الكربونات والبيكربونات للقلويات ومعادن الأرض القلوية في الماء ، وفي الواقع العملي تساوي في الماء العادي كمية بيكربونات الكالسيوم . وقد اصطلح الألمان تعريف قلوية برتقالي الميثيل باصطلاح Saurebindungsvermogen واختصارها SBV (أي مقدرة الارتباط بالحامض) . ووحدة SBV تشير إلى واحد ميلليمكافئ في لتر ماء ، أو ٥٠ مجم كربونات كالسيوم / لتر، أو ٢٨ مجم أوكسيد كالسيوم / لتر، وبضرب قيمة SBV في ٢,٨ أو ٥ يمكن الحصول على عسر الكالسيوم فى الماء كدرجات عسر ألمانية أو فرنسية على الترتيب . وتقدير SBV يكافىء تقدير عسر الكالسيوم رغم اختلاف صور التعبير . وكلما زادت القلوية زادت ثبات PH الماء .

وتقدر قلوية برتقالي الميثيل SBV بأخذ ١٠٠مل ماء في دورق مدرج مع ٣ نقط محلول دليل برتقالي الميثيل (٠,١ ٪) ، وباستخدام سحاحة مدرجة يضاف حمض هيدروكلوريك ٠,١ عياري بالتنقيط مع الرج حتى يتحول اللون الأصفر لبرتقالي الميثيل إلى اللون الوردي. ويعبر عن قلوية برتقالي الميثيل بعدد السنتيمترات المكعبة من حمض الهيدروكلوريك العياري المستخدمة لكل لتر ماء (وهو نفس عدد ملليلترات الحمض ٠,١ عياري المستخدمة لحجم ١٠٠ مل ماء) .

وأهمية SBV في زراعة السمك أنه بارتفاع قيمتها تدل على ثبات درجة حموضة الماء، ولدرجة معينة (طالما كانت أقل من ٣,٥) فإن زيادتها تزيد إنتاجية الماء . فالماء الفقير جدا تكون SBV له أقل من ٠,١ ، بينما إذا كانت بين ٠,١ و٠,٣ فإن الماء يعتبر فقيرا ، بين ٠,٣ و١,٥ يعتبر الماء متوسطاً ، وأعلى من ١,٥ SBV يكون الماء غنياً . والماء أعلى من

SBV ٣,٥ يعتبر لحد ما أقل جودة للتكلس الذي يعيق تطوير الغطاء البيولوجى . وتؤدي عملية تجيير الحوض إلى زيادة القلوية (SBV) .

ولتحويل القلوية الكلية أو قلوية برتقالي الميثيل (جزء / مليون كربونات كالسيوم) إلى قيمة مكافئة SBV يقسم على ٥٠ ، ولتحويل SBV إلى قلوية كلية أو قلوية برتقالي (جزء / مليون كربونات كالسيوم) يضرب في ٥٠ .

١٠ ـ عسر الماء :

أ ـ العُسر المؤقت والدائم والكلي :

عسر الماء المؤقت يرجع لوجود كربونات وبيكربونات الكالسيوم والماغنسيوم ، بينما العسر الدائم يرجع عادة إلى كبريتات الكالسيوم رغم وجود كبريتات وكلوريد الكالسيوم والماغنسيوم . ويقدر العسر المؤقت في الماء بالمعايرة بحمض كبريتيك قياسي في وجود دليل برتقالي الميثيل ، بينما يقدر العسر الدائم بتسجيل حجم الصودا الكاوية القياسية وكربونات الصوديوم اللازمة لترسيب الكبريتات الموجودة في الماء .

فيقدر العسر المؤقت بمعايرة ١٠٠ مل ماء بحمض كبريتيك ٠,٠٢ عياري باستخدام دليل برتقالي الميثيل حتى ظهور لون أحمر باهت (١مل حمض كبريتيك ٠,٠٢ عياري = ٠,٠٠١ جم كربونات كالسيوم) .

العسر المؤقت مجم كربونات كالسيوم / لتر =

$$\frac{\text{حجم الحامض المستخدم في المعايرة} \times ٠,٠٠١ \times ١٠٠٠ \times ١٠٠٠}{١٠٠}$$

ولتقدير العسر الدائم يؤخذ ١٠٠ مل عينة ، وتغلى لطرد ك أ٢ ، ثم يضاف إليها ١٠ مل صودا كاوية ٠,١ عياري + ١٠ مل كربونات صوديوم لامائية ٠,١ عياري (سخن كربونات صوديوم لامائية في صينية بلاتين على لهب أحمر ، برد ، زن ٥,٣ جم وخففها في لتر ماء) . بخر حتى يبقى ٤٠ مل ، برد ورشح . اجمع الراشح في دورق معياري ١٠٠ مل ، واغسل ورقة الترشيح بماء مقطر خال من ك أ٢ حتى زوال القلوية (اختبر بالفينولفثالين) ، أكمل الراشح إلى العلامة . خذ من الراشح ٥٠ مل وعايرها بحمض كبريتيك ٠,١ عياري باستخدام دليل برتقالي الميثيل . اجر تجربة خالية من ١٠ مل صودا كاوية ٠,١ عياري + ١٠ مل كربونات صوديوم ٠,١ عياري في دورق معياري ١٠٠ مل وأكمل للعلامة بالماء المقطر الخالي من ك أ٢ وعاير منها ٥٠ مل بحمض الكبريتيك ٠,١ عياري في وجود برتقالي الميثيل (١ مل حمض كبريتيك ٠,١ عياري = ٠,٠٠٥ جم كربونات كالسيوم) .

العسر الدائم مجم كربونات كالسيوم / لتر =

$$\frac{\text{(حجم الحامض المعاير للعينة الخالية – حجم الحامض المعاير للعينة)} \times ٢ \times ٠,٠٠٥ \times ١٠٠٠ \times ١٠٠٠}{١٠٠}$$

وعليه فيكون العسر الكلي للماء = العسر المؤقت + العسر الدائم .

وتتوقف حالة الماء على العسر كما يصوره الجدول التالي :

العسر ككربونات كالسيوم جزء / مليون	حالة الماء
أقل من ٥٠	يسر
٥٠ – ١٠٠	عسر نوعا
١٠٠ – ٢٠٠	عسر
أعلى من ٢٠٠	عسر جداً

ب ـ العُسر الراجع للكالسيوم والماغنسيوم :

Hardness due to Ca^{++} and Mg^{++}

استخدم العسر قديما لوصف قدرة الماء على ترسيب الصابون لوجود أيونات الكالسيوم والماغنسيوم . بينما في المملكة المتحدة والولايات المتحدة فهناك تعريف قياسي للعسر الكلي على أنه مجموع تركيزات الكالسيوم والماغنسيوم معبرا عنها بتركيز مكافئ لكربونات الكالسيوم بالمليجرام / لتر . ويحسب العسر من التركيزات المنفصلة لكل من العنصرين ، واستخدام المعادلة التالية :

العسر ككربونات كالسيوم مجم / لتر = ٢,٤٩٧ (تركيز الكالسيوم مجم / لتر)
+ ٤,١١٨ (تركيز الماغنسيوم مجم / لتر) .

وهناك نظام بديل يستخدمه معظم المتخصصين في علوم البحار للتعبير عن العسر كمجموع التركيزات المنفصلة لأيونات كل من الكالسيوم والماغنسيوم سواء بالمليمكافئ / لتر أو مليمول / لتر (هذه القيم متساوية عدديا) .

ويرتبط العسر مع القلوية ومع القدرة التنظيمية للماء ارتباطا موجبا ، حيث إن الأيونات السالبة الأساسية المرتبطة بكاتيونات (أيونات موجبة) الكالسيوم والماغنسيوم عادة بيكربونات وكربونات .

ورغم أن الماء العسر Hard Water أكثر إنتاجا بيولوجيا عن المياه اليسرة Soft Waters التي يعوزها الكالسيوم والماغنسيوم ، إلا أن العسر قد يؤدي إلى انتشار الطحالب واستهلاك

الأوكسجين .

شدة العسر رغم ذلك تخفض من سمية أيونات العناصر الثقيلة (كالنحاس والزنك) للسمك واللافقاريات . وكذلك فإن وجود درجة معينة من العسر يعتبر شيئا أساسيا لحياة ونمو عديد من محار وقشريات الماء العذب المستزرعة خاصة الأربيان (كركند) Crayfish (Craw Fish) وهو نوع من الجمبري الكبير Lobster .

ويجرى تقدير كل من الكالسيوم والماغنسيوم باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري Atomic Absorption Spectrophotometer (A A S) إلا أنه مكلف ولا يتوفر لأعمال الحقل ، لذلك يقدر المعدنين بالتنقيط بمحلول دي صوديوم إيثيلين دي أمين تترا أسيتك أسد Di - Sodium Salt of Ethylenediaminetetra - Acetic Acid (ملح EDTA) والذي يكون معقدا ثابتا لا يتأين مع أيونات الكالسيوم والماغنسيوم مع استخدام صبغة أزرق / أسود سولوكروم أسود Blue - Black dye Solochrome Black T (= Erioch- rome Blackt = CI Mordant Black 11) فإضافة الصبغة إلى عينة الماء تكون معقدا بنفسجيا مع أيونات العنصرين ، والتنقيط بمحلول EDTA يفك العنصرين من المعقد مع نهاية التفاعل عند نقطة النهاية التي يتغير عندها لون الصبغة ثانية إلى الأزرق .

وإذا أريد تقدير كل من المعدنين مفصلا فيستخدم دليل جليوكسال بيس -٢- هيدروكسانيل Glyoxal-bis-(2-Hydroxanil) (=Di-(O-Hydroxy Phenylimino)-Ethane) لتكوين معقد أحمر مع أيونات الكالسيوم فقط ، وينقط بمحلول EDTA لإزالة أيونات الكالسيوم من المعقد ويعود الدليل إلى لونه الأصلي أصفر . ويستنتج تركيز الماغنسيوم بالفرق ، أي بطرح تركيز الكالسيوم بمفرده من تركيز الكالسيوم مع الماغنسيوم .

الكيماويات :

أ ـ محلول Na_2 EDTA يحضر بإذابة ١,٠٠ جم من الملح في ٨٠٠ مل ماء مقطرا ، ويضاف ٥,٤ مل هيدروكسيد صوديوم ١ مولر ، ويخفف إلى لتر ، فيكون كل ١ مل مكافئ تقريبا لتركيز ٥,٠ ميكرومول من كل من العنصرين .

ب ـ دليل سولوكروم أسود T يحضر بطحن ٠,٢ جم من الدليل مع ٥٠ جم كلوريد صوديوم نقي في هاون Mortar ، ويحفظ جافا في إناء محكم .

جـ ـ محلول منظم بوراكس PH ١٢ يحضر بإذابة ٨ جم بوراكس $Na_2B_4O_7.10H_2O$ في ١٦٠ مل ماء مقطرا . أذب ٢ جم هيدروكسيد صوديوم + ١ جم صوديوم مونوسلفيد $Na_2S.9H_2O$ في ٢٠ مل ماء . اخلط المحلولين وخفف إلى ٢٠٠ مل قبل العمل مباشرة، خفف ١٠ مرات بالماء المقطر .

د – محلول كالسيوم قياسى : بإذابة ٢,٥٠٢ جم كربونات كالسيوم جافة $CaCO_3$ فى ٨٠٠ مل ماء ، واخلط ثم أضف بماصة ٥٠ مل جمض هيدروكلوريك ١ مولر ، وأكمل إلى لتر ١ مل يحتوى ٥٠,٠ ميكرومول كالسيوم .

هـ – محلول ماغنسيوم قياسى : أذب ٦,١٦٢ كبريتات ماغنسيوم جافة. $Mg SO_4 . 7 H_2 O$ فى لتر ماء مقطر . ١ مل يحتوى ٥٠,٠ ميكرومول ماغنسيوم .

و – محلول هيدروكسيد صوديوم ٠,١ مولر .

ر – دليل الكالسيوم : أذب ٠,٠٣ جم جليوكسال – بيس – ٢ – هيدروكسيانيل فى ميثالول وأكمل إلى ١٠٠ مل .

التقدير :

يعاير محلول DTA E بخلط ١٠,٠ مل من محلول كالسيوم قياسى (د) مع ١٠,٠ ملش محلول ماغنسيوم قياسي (هـ) ويخفف إلى لتر فيكون فيه ١ مل محتويا على ٠,٥٠٠ ميكرومول كالسيوم + ٠,٥٠٠ ميكرومول ماغنسيوم في دورق مخروطي ١٠٠ مل، أضف ١٠,٠ مل من محلول المعادن القياسي المخفف مع ١ مل محلولا منظماً (حـ) وحوالي ١٠٠ مجم من مخلوط الدليل (ب) ، وسخن على ٧٠ْم ونقط بمحلول EDTA (أ) من سحاحة سعة ٢ أو ٥ مل مع ثبات الرج حتى يتغير اللون الأحمر إلى الأزرق . ينبغي أن يكون حجم EDTA (ح) المستهلك ٢,٠٠ مل ، حيث إن ١,٠٠ مل منها يجب أن يكافئ ٥,٠ ميكرومول من أي من الكالسيوم أو الماغنسيوم ، فإذا لم يكن الأمر كذلك فاستخدم معامل تصحيح (× ٢,٠٠ ÷ ح) لحجوم EDTA المضافة لعينات الماء التي سيقدر عسرها.

في دوارق سعة ١٠٠ مل أضف في كل منها حتى ٢٥ مل من عينات الماء ثم أضف ١ مل محلولاً منظماً مخففا (حـ) وحوالي ١٠٠ مجم دليلا (ب) وسخن على ٧٠ْم مع الرج الثابت ونقط بمحلول EDTA (أ) من سحاحة ٢ مل حتى يتحول اللون الأحمر إلى أزرق حاد (الماء العسر يترسب فيه كربونات الكالسيوم عند تسخين المحلول المنظم ؛ لذلك يجب إضافة حمض هيدروكلوريك مخفف بكم يكافئ قلوية العينة ، ثم يزال ثاني أوكسيد الكربون المتحرر بالتسخين والرج قبل إضافة المحلول المنظم) .

ولتقدير الكالسيوم فقط يحدد أولاً نقطة النهاية القياسية بإضافة ١٠ مل من مخلوط الكالسيوم والماغنسيوم القياسي المخفف (تحتوي ٥,٠ ميكرومول كالسيوم) في دورق مخروطي ١٠٠ مل ثم أضف ٥ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,١ مولر لترسيب الماغنسيوم ، ثم أضف ٣ مل من دليل الكالسيوم (ز) . وباستخدام سحاحة ٢ أو ٥ مل أضف بحرص نصف الحجم (ح) المستهلك من قبل من محلول EDTA المستخدم في المعايرة الأولى

(أي ١ مل إذا كانت ح = ٢ مل) فيتحول اللون الأحمر إلى أصفر وهي نقطة النهاية القياسية .

بعد ذلك يؤخذ حتى ٢٥ مل من العينة في دورق ١٠٠ مل ويضاف إليها ٥ مل هيدروكسيد صوديوم ١,٠ مولر ، ثم ٣ مل دليل كالسيوم ، وينقط ببطء بمحلول EDTA حتى نقطة النهاية القياسية .

الحساب :

إذا كانت ح١ = حجم EDTA بالمليلتر المستهلكة في تنقيط الكالسيوم والماغنسيوم والمعدلة طبقا لمعايرة محلول EDTA ، ح٢ = حجم EDTA بالمليلتر المستهلكة في تنقيط الكالسيوم فقط ومعدل طبقا لمعايرة محلول EDTA ، ح٣ = حجم عينة الماء بالمليلتر .

فإن تركيز الكالسيوم ملى مول / لتر = $\frac{ح٢}{ح٣}$ (× ٢٠,٠٤ = مجم / لتر)

وتركيز الماغنسيوم ملى مول / لتر = $\frac{(ح١ - ح٢) × ٥}{ح٣}$ (× ١٢,١٦ = مجم / لتر)

بينما العسر الكلي كتركيز مكافئ كربونات كالسيوم فيضرب التركيز بالملي مول/ لتر في الوزن المكافئ لكربونات الكالسيوم (٥٠,٠٤) . فيكون العسر مجم مكافئ كربونات كالسيوم / لتر =

٥٠,٠٤ [(تركيز الكالسيوم ملي مول/لتر) + (تركيز الماغنسيوم ملي مول/لتر)] .

ولحساب العسر الراجع للكاتيونات الأخرى تضرب تركيزاتها (مجم / لتر) في العومل ١,٧٩٢ للحديد ، ١,١٤٢ للسترانشيوم ، ٣,٧١٠ للألومنيوم ، ١,٥٣١ للزنك ، ١,٨٢٢ للمنجنيز .

١١ـ الملوحة :

تقدير الملوحة بالتنقيط Determination of Salinity by Titration :

تعرف عملية تقدير ملوحة ماء البحر بالتنقيط للهالوچينات القابلة للترسيب (كلوريد ، بروميد ، يوديد) بنترات الفضة بتنقيط موهر Mohr Titration ، وهي طريقة غير مباشرة ، إذ تقيس الهالوچينات في صورة كلور (جم / لتر) Chlorosity عند درجة حرارة قياسية (عادة ٢٠ْم) . بينما مجموع الهالوچينات في العينة Chlorinity تقدر بوزن الهالوچينات في كيلو جرام ماء بحر ، ويعبر عنها بتركيز الكلور في الألف (Cl ‰) ويتحصل عليها من قسمة التركيز ككلور / لتر Chlorosity على كثافة ماء البحر (d) . ويعبر عن الملوحة (S ‰) بالمعادلات التالية :

$$S ‰ = 0.03 + 1.805\ Cl ‰$$
$$= 0.03 + 1.805\ \frac{Cl / l}{d}$$

على أن تكون كل من الكثافة والملوحة في صورة Cl / l مقدرتان على نفس درجة الحرارة .

والأفضل جمع العينات في أوان زجاجية سعة ١٠٠ - ٢٠٠ مل وتسد بفلين منقوع في شمع برافين منصهر ، ولو جمعت في أواني بولي ثين ذات غطاء مانع فإنها تناسب التقدير الأقل دقة . وتغسل الأواني أولا ٣ مرات من نفس ماء العينة ، ثم تملأ وتسد ، ثم يغمس عنق الأواني في شمع منصهر . عند التقدير ترج الأواني عدة مرات قبل فتحها لإذابة أي أملاح ترسبت على السدادة .

أ ـ طريقة تقدير الملوحة بسرعة للتحاليل الروتينية (منخفضة الدقة) :

الكيماويات :

يذاب ٢٧,٢٥ جم نترات فضة $A_g NO_3$ في لتر ماء مقطراً ويحفظ في آنية معتمة .
محلول الدليل يحضر بإذابة ١٠ جم كرومات بوتاسيوم K_2CrO_4 في ١٠٠ مل ماء مقطراً .

التقدير :

ينقل بماصة ١٠,٠ مل عينة إلى دورق ويضاف عليها عدة نقط من الدليل ، وينقط عليها بنترات الفضة من سحاحة سعة ٥٠ مل مع استمرار الرج حتى بداية تغيير اللون من الأصفر إلى الأحمر البني ولا يعود للأصفر بالهز . حجم محلول النترات المستهلك بالمليلتر يساوي عدديا الملوحة للعينة .

ب ـ طريقة تقدير المملوحة بدقة متوسطة :

الكيماويات :

١ ـ ماء بحر قياسي : اجمع حجما كبيرا (٢٠ لتراً) من ماء بحر مفتوح نظيف (يفضل من عمق أكبر من ٥٠ مترا) ، رشح ثم ضع منها في أواني عينات وقدر بدقة محتوى الهالوچينات (جم كلور / لتر) لعدد ممثل من أواني العينات ، سواء بجهاز قياس الملوحة أو بالتنقيط . وكبديل يمكن تحضير محلول كلوريد صوديوم قياسي يحتوي ٣٢,٧٢٥ جم كلوريد صوديوم مذابة في ماء مقطر على ٢٠°م ، ويخفف إلى لتر ، فلهذا المحلول تركيز هالوچينات ١٩,٣٨ ./ .. (جم / كجم) أو ١٩,٨٧ (جم / لتر) وتكافئ ملوحة ٣٥,٠/ جزء / ألف .

٢ ـ محلول نترات فضة قياسي حوالي ٠,٢٨ مولر بإذابة ٤٩ جم نيترات فضة نقية في لتر ماء مقطرا ، ويحفظ في أوان قاتمة مغطاة بورق الألومنيوم .

٣ ـ محلول دليل بإذابة ٣,٥ جم كرومات بوتاسيوم نقية في ماء ويخفف إلى لتر .

التقدير :

يجب أن تكون درجة حرارة نترات الفضة وماء البحر القياسي والعينات متقاربة في

حدود ٣°م ، وتحفظ كلها معا عدة ساعات قبل التقدير ، ويجب أن تكون كافة الأواني الزجاجية المستخدمة نظيفة بنقعها دوريا في حمض كروميك . استخدم البارافين (وليس السليكون) لدهان صنبور السحاحة . تجنب استخدام الأواني في ضوء الشمس المباشر .

عاير محلول نترات الفضة ضد عدة حجوم (١٠,٠ مل) من ماء البحر القياسي (أو محلول كلوريد الصوديوم) ما سيلي وصفه في تحليل العينات ، واضبط قوة نترات الفضة بإضافة كميات بسيطة من الماء حتى يصير متوسط حجم النترات المستهلك في التنقيط مثل (± ١,٠) ملوحة ماء البحر القياسي جم كلور / لتر على ٢٠°م . واحسب المعامل (م)

$$= \frac{ح_{ق}^{٢}}{١٠٠\ (ح_{م} - ح_{ق}) + ١}$$

حيث $ح_{ق}$ = متوسط حجم نترات الفضة المستهلك في تنقيط ماء البحر القياسي .

$ح_{م}$ = ملوحة ماء البحر القياسي (جم كلور / لتر على ٢٠°م) .

ولتحليل العينات انقل بماصة ١٠,٠ مل ماء بحر (عينة) إلى كأس سعة ٢٠٠ مل + ١٥ مل محلول دليل ، ثم نقط بنترات الفضة من سحاحة سعة ٢٥ مل باستخدام مقلب مغناطيسي Magnetic Stirrer مع تماثل درجة حرارة كل المحاليل .

حساب الملوحة :

إذا كان حجم نترات الفضة المستهلكة في تنقيط العينة = ح فإن الملوحة مقدرة بالجم كلور / لتر على ٢٠°م = ح + ت حيث ت = تصحيح المعايرة التي تتوقف على قيم $(ح_{م} - ح_{ق})$ ، ح ، وتستخرج (ت) لأي قيمة من (ح) من الجدول التالي حيث (م) هي المعامل سابق ذكره .

ح	ت
٠,٠٠ – م	٠,٠٠
م – ٢م	$(ح_{م} - ح_{ق}) \times$ م
٢م – ٣م	٢ $(ح_{م} - ح_{ق}) \times$
٣م – ٤م	٣ $(ح_{م} - ح_{ق}) \times$
	وهكذا

ثم تحول الملوحة جم كلور / لتر إلى ملوحة ٠/٠٠ بالرجوع إلى الجدول التالي :

جم كلور / لتر على ٢٠°م	ملوحة ٠/٠٠									
	٠,٠	٠,١	٠,٢	٠,٣	٠,٤	٠,٥	٠,٦	٠,٧	٠,٨	٠,٩
٢	٣,٦	٣,٨	٤,٠	٤,٢	٤,٤	٤,٥	٤,٧	٤,٩	٥,١	٥,٢
٣	٥,٤	٥,٦	٥,٨	٦,٠	٦,٢	٦,٣	٦,٥	٦,٧	٦,٩	٧,٠
٤	٧,٢	٧,٤	٧,٦	٧,٨	٧,٩	٨,١	٨,٣	٨,٥	٨,٦	٨,٨
٥	٩,٠	٩,٢	٩,٤	٩,٥	٩,٧	٩,٩	١٠,١	١٠,٣	١٠,٤	١٠,٦
٦	١٠,٨	١١,٠	١١,١	١١,٣	١١,٥	١١,٧	١١,٨	١٢,٠	١٢,٢	١٢,٤
٧	١٢,٦	١٢,٧	١٢,٩	١٣,١	١٣,٣	١٣,٥	١٣,٦	١٣,٨	١٤,٠	١٤,٢
٨	١٤,٣	١٤,٥	١٤,٧	١٤,٩	١٥,٠	١٥,٢	١٥,٤	١٥,٦	١٥,٧	١٥,٩
٩	١٦,١	١٦,٣	١٦,٥	١٦,٦	١٦,٨	١٧,٠	١٧,٢	١٧,٣	١٧,٥	١٧,٧
١٠	١٧,٩	١٨,٠	١٨,٢	١٨,٤	١٨,٦	١٨,٧	١٨,٩	١٩,١	١٩,٣	١٩,٤
١١	١٩,٦	١٩,٨	٢٠,٠	٢٠,١	٢٠,٣	٢٠,٥	٢٠,٧	٢٠,٩	٢١,٠	٢١,٢
١٢	٢١,٤	٢١,٦	٢١,٧	٢١,٩	٢٢,١	٢٢,٢	٢٢,٤	٢٢,٦	٢٢,٨	٢٣,٠
١٣	٢٣,١	٢٣,٣	٢٣,٥	٢٣,٦	٢٣,٨	٢٤,٠	٢٤,٢	٢٤,٤	٢٤,٥	٢٤,٧
١٤	٢٤,٩	٢٥,٠	٢٥,٢	٢٥,٤	٢٥,٦	٢٥,٧	٢٥,٩	٢٦,١	٢٦,٣	٢٦,٤
١٥	٢٦,٦	٢٦,٨	٢٧,٠	٢٧,١	٢٧,٣	٢٧,٥	٢٧,٦	٢٧,٨	٢٨,٠	٢٨,٢
١٦	٢٨,٤	٢٨,٥	٢٨,٧	٢٨,٩	٢٩,٠	٢٩,٢	٢٩,٤	٢٩,٦	٢٩,٧	٢٩,٩
١٧	٣٠,١	٣٠,٢	٣٠,٤	٣٠,٦	٣٠,٨	٣٠,٩	٣١,١	٣١,٣	٣١,٥	٣١,٦
١٨	٣١,٨	٣٢,٠	٣٢,١	٣٢,٣	٣٢,٥	٣٢,٧	٣٢,٨	٣٣,٠	٣٣,٢	٣٣,٤
١٩	٣٣,٥	٣٣,٧	٣٣,٩	٣٤,٠	٣٤,٢	٣٤,٤	٣٤,٦	٣٤,٧	٣٤,٩	٣٥,١
٢٠	٣٥,٣	٣٥,٤	٣٥,٦	٣٥,٨	٣٥,٩	٣٦,١	٣٦,٣	٣٦,٤	٣٦,٦	٣٦,٨
٢١	٣٧,٠	٣٧,١	٣٧,٣	٣٧,٥	٣٧,٧	٣٧,٨	٣٨,٠	٣٨,٢	٣٨,٣	٣٨,٥
٢٢	٣٨,٧									

١٢ ـ الكلور والكلوريدات :

الكلور في المحاليل المائية غير ثابت ؛ لذلك عند تقديره يجب أن تكون العينة طازجة عقب جمعها مباشرة ، مع تفادي الضوء الزائد والرج .

خذ ٥٠٠ مل عينة وأضف إليها حمض خليك ثلجي لخفض PH ما بين ٣-٤ ، أضف ١ جم يوديد بوتاسيوم ، ثم عاير بمحلول ثيوكبريتات صوديوم ٠,٠٢٥ عياري حتى

يختفي تقريباً اللون الأصفر الناتج من تحرر اليود . أضف ١ مل دليل نشا ، وأكمل المعايرة حتى اختفاء اللون الأزرق .

اجر تجربة خالية على حجم ماء مقطر مساو لحجم العينة ، وأضف إليها ٥ مل حمض خليك ثلجي + ١ جم يوديد بوتاسيوم + ١ مل محلول نشا ، فإذا ظهر لون أزرق فعاير بثيوكبريتات الصوديوم حتى اختفاء اللون الأزرق ، وسجل حجم الثيوكبريتات (أ) ، وإذا لم يظهر اللون الأزرق فعاير بمحلول يوديد بوتاسيوم ٠,٠٢٥ عياري حتى ظهور اللون الأزرق ، ثم عاير عكسيا بثيوكبريتات الصوديوم ٠,٠٢٥ عياري حتى اختفاء اللون الأزرق ، وسجل الفرق بين حجم المعايرتين (ب) .

لحساب تركيز الكلور في العينة من معايرتها بالثيوكبريتات فيطرح (أ) ، أو يضاف (ب) إلى حجم الثيوكبريتات المستخدمة في معايرة العينة وتستخدم الأخيرة في المعادلة التالية :

$$\text{مجم كلور / لتر} = \frac{\text{حجم الثيوكبريتات} \times \text{عيارية الثيوكبريتات} \times ٣٥,٤٦ \times ١٠٠}{\text{حجم العينة (مل)}}$$

والكلوريدات في المياه قد تدل على تلوث بالصرف الآدمي لغنى بول الإنسان بالكلوريدات ، وهي كذلك دليل على عدم ملاءمة المياه الجوفية للاستخدام لأضرار الكلوريدات على الكائنات النباتية والحيوانية في بيئة الماء العذب .

وقد تقدر الكلوريدات باستخدام القياس الطيفي ، إلا أنها تقدر كذلك بضبط PH الماء ما بين ٥ و ٩,٥ ثم يؤخذ منه ٢٠سم^{٣} في دورق مدرج مع ٤سم^{٣} ماء خالي التأين + ١سم^{٣} محلول كرومات بوتاسيوم ٥٪ ، وتعاير بمحلول ٣٥,٥/١ عياري نترات فضة حتى يتحول اللون من الأصفر إلى الأحمر الفاقع ، ويحسب تركيز الكلوريدات (أيونات كلوريد بالمليجرام / لتر) = $\frac{\text{حجم نترات الفضة} \times ١٠٠٠}{\text{حجم العينة}}$.

١٣ ـ تحليل المغذيات Analysis of Nutrients :

ويقصد بها مركبات النيتروچين والفوسفور في الماء العذب أو ماء البحر وذلك بطرق سريعة لكن منخفضة الدقة أو بطرق أكثر دقة وحساسية . يجب سرعة ترشيح العينات بقدر الإمكان على ورقة ترشيح GF/C سابق الغسيل ، أو على مرشحات حجم ثقوبها ٠,٤٥ ميكرومتر .

أ ـ النيتروچين :

في صوره العضوية وغير العضوية مصادر هامة للمغذيات ونواتج إخراج للنباتات والحيوانات المائية :

١ ـ الأمونيا :

تعتبر أحد المغذيات الهامة للبلانكتون النباتي ، كما أنها أكبر ناتج هدم نهائي للبروتين

الذى يخرج من الحيوانات البحرية وتنتج بعد تحلل اليوريا وبقايا المادة العضوية وتوجد في شكلين غير متأينة (NH_3) ومتأينة (NH_4^+) . والأمونيا غير المتأينة تعتبر سامة للأسماك والحيوانات الأخرى . ويجب قياس درجة حرارة و PH الماء وقت أخذ العينات لحساب النسبة المئوية للأمونيا غير المتأينة كما سيلي بعد ذلك . يجب إجراء تقدير الأمونيا في خلال ٣ ساعات من أخذ العينات ، وإذا كانت العينات ستحفظ فترة أطول من ذلك فترشح وتجمد ، وقد يضاف إليها ٠,٨ مل حامض كبريتيك مركزا (١٨ مولر) لكل لتر عينة مرشحة (تعادل بصودا كاوية أو بوتاسيا كاوية قبل التقدير) .

طريقة الفينول / هيبوكلوريت في الماء العذب :

تتفاعل الأمونيا مع الفينول والهيبوكلوريت في محلول قلوي لتكون أزرق إندوفينول ، ويستخدم نيتروبروسيد الصوديوم لتكثيف اللون الأزرق على درجة حرارة الغرفة .

الكيماويات :

١ ـ محلول منظم نيتروبروسيد – فينول : يذاب ٣٠ جم فوسفات صوديوم $Na_3 PO_4 . 12 H_2O$ مع ٣٠جم سيترات صوديوم $Na_3 C_6 H_5 O_7 . 2 H_2O$ مع ٣جم Na$_2$ EDTA في ماء مقطر ويكمل إلى لتر ، أذب ٦٠ جم فينول $C_6 H_5 OH$ مع ٠,٢ جم صوديوم نيتروبروسيد $Na_2 [Fe (CN)_5 NO] . 2H_2O$ في هذا المحلول ، واحفظه في إناء داكن في ثلاجة (سام احذر) فيظل صالحا لمدة ٢–٣ أسابيع .

٢ ـ محلول هيبوكلوريت قلوي : أضف ٣٠ مل محلول تبييض Bleach Solution تجاري هيبوكلوريت صوديوم Na Cl O (تحتوي على ١٠–١٤٪ كلور) إلى ٤٠٠ مل هيدروكسيد صوديوم ١ مولر ، وخفف بالماء المقطر إلى لتر ، واحفظه في إناء داكن في ثلاجة فيظل صالحا لمدة ٣–٤ أسابيع .

٣ ـ محلول أمونيا شبيه بالمحضر في طريقة الإلكترود .

التقدير :

خذ عينة ٢٥ مل أضف إليها ١٠ مل محلول نيتروبروسيد فينول (١) واخلط ، وبسرعة أضف ١٥ مل محلول هيبوكلوريت قلويا (٢) ، وغط الدوارق واتركها لمدة ساعة فى الظلام على درجة حرارة الغرفة. اللون ثابت لمدة يوم على الأقل . قس امتصاص الضوء للمحلول القياسي والعينات ضد عينة خالية Blank على ٦٣٥ نانومتر .

طريقة مطورة لماء البحر :

الكيماويات :

١ ـ محلول فينول : أذب ٢٠جم فينول في ٢٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥٪ .

٢ ـ محلول نيتروبروسيد صوديوم : أذب ١,٠ جم صوديوم نيتروبروسيد في ٢٠٠ مل

ماء مقطر واحفظه في إناء كهرمان Amber Bottle في ثلاجة فهو صالح على هذه الحالة على الأقل لمدة شهر .

٣ ـ دليل قلوي : أذب ١٠٠ جم سيترات صوديوم مع ٥ جم هيدروكسيد صوديوم في ٥٠٠ مل ماء مقطراً .

٤ ـ هيبوكلوريت صوديوم تجاري (محلول تبييض) .

٥ ـ محلول مؤكسد : اخلط ١٠٠ مل من الدليل القلوي (٣) مع ٢٥ مل من الهيبوكلوريت (٤) ، ويحضر هذا المحلول أولاً بأول قبل الاستخدام مباشرة ، فهو ثابت لمدة أقل من يوم .

٦ ـ محلول أمونيا : شبيهه بالمحضر في طريقة الإلكترود .

التقدير :

خذ ٥٠ مل من العينة ، وأضف إليها ٢ مل محلول فينول (١) ، واخلط ثم أضف ٢ مل محلول نيتروبروسيد (٢) مع ٥ مل محلولا مؤكسدا (٥) وغط قمة الدورق بعيداً عن ضوء الشمس المباشرة ، وقدر امتصاص الضوء على ٦٤٠ نانومتر بعد ساعة من حفظه على درجة حرارة الغرفة .

ولحساب النسبة المئوية للأمونيا غير المتأينة من الأمونيا الكلية المقدرة بالطرق السابقة ، فإن نسبة الأمونيا غير المتأينة تتوقف على PH ودرجة حرارة الماء وقت أخذ العينة وتستخدم لذلك المعادلة التالية :

$$\text{٪ أمونيا غير متأينة} = \frac{\text{١٠٠}}{\text{١} + (\text{اللوغاريتم السالب لثابت التأين} - PH)}$$

ويستخرج اللوغاريتم السالب لثابت التأين (والذي يعتمد على درجة الحرارة) من الجدول التالي :

درجات الحرارة م ْ	٥	١٠	١٥	٢٠	٢٥	٣٠
اللوغاريتم السالب لثابت التأين	٩,٩٠	٩,٧٣	٩,٥٦	٩,٤٠	٩,٢٤	٩,٠٩

تقدير الأمونيا بطريقة حمض البوريك :

في حالة ارتفاع محتوى الماء من الأمونيا يفضل تقدير أزوت الأمونيا بامتصاص الأمونيا من ناتج تقطير العينة في محلول حمض بوريك ، فهي أكثر دقة .

الكيماويات :

١ ـ ماء خالي الأمونيا : يضاف بضع نقط من البروم في ماء مقطر ويترك ليلة ثم يعاد تقطيره ، ويزال أول ١٠٠ مل من المتقطر ويجمع الباقي .

٢ ـ حامض كبريتيك ٠,٠٢ عياري .

٣ ـ محلول حمض البوريك : أذب ٢٠ جم حمض بوريك خالي الماء H_3BO_3 في ماء خالي الأمونيا وأكمل إلى لتر .

٤ ـ محلول كلوريد أمونيوم قياسي : أذب ٣,٨١٩ جم NH_4Cl في ماء خالي الأمونيا، وخفف إلى لتر ، ثم خفف ١٠ مل منه إلى لتر بماء خالي الأمونيا (١ مل = ٠,٠١ مجم أزوت = ٠,٠١٢٢ مجم أمونيا) .

٥ ـ محلول منظم فوسفات PH ٧,٤ : أذب ١٤,٣ جم KH_2PO_4 + ٦٨,٨ K_2HPO_4 في ماء خالي الأمونيا وخفف إلى لتر .

٦ ـ دليل نسلر : أذب ١٠٠ جم يوديد زئبقيك HgI_2 + ٧٠ جم يوديد بوتاسيوم KI في قليل من ماء خالي الأمونيا . ثم أذب ١٦٠ جم صودا كاوية NaOH في ٥٠٠ مل ماء خالي الأمونيا ثم برد . أضف المحلول الأول إلى الثاني ببطء مع التقليب ثم خفف إلى لتر واحفظ في إناء معتم .

٧ ـ مخلوط دليل : أذب ٠,٢ جم أحمر ميثيل + ٠,١ جم أزرق ميثيلين في كحول ٩٥٪ ، وخفف إلى ٣٠٠ مل بالكحول ٩٥٪ .

التقدير :

ركب جهاز تقطير ، وضع في دورق التقطير ٥٠٠ مل ماء مقطرا + ١٠ مل محلول منظم فوسفات ، ومرر البخار ، واستقبل المتقطر واكشف فيه عن الأمونيا ، واستمر في التقطير حتى تتأكد من خلو المتقطر من الأمونيا (باستخدام دليل نسلر) . أفرغ دورق التقطير ، وضع بها ٥٠٠ مل عينة مع ضبط PH العينة إلى ٧ بحمض مخفف أو قلوي مخفف . ثم أضف ١٠ مل محلول منظم فوسفات . إذا كانت بالعينة كلور فأزل الكلور بأثار من ثيوكبريتات الصوديوم . وإذا كان بالعينة كبريتيد هيدروچين فيضاف قليل من كربونات الرصاص أو خلات الزنك لمنع خروج الكبريتيد مع المتقطر . اجمع ٥٠ مل من المتقطر في ٥٠ مل محلول حمض بوريك . كل مجم زيادة من نيتروچين الأمونيا يتطلب إضافة ٥٠ مل أخرى من محلول حمض البوريك . بعد التقطير أكمل إلى حجم معلوم وقدر الأمونيا فيه بالتنقيط بحمض كبريتيك ٠,٠٢ عياري باستخدام مخلوط دليل حتى نقطة النهاية بظهور لون لافندر فاتح Pale Lavender . مجم/لتر NH_3 =

$$\frac{\text{(مل حمض كبريتيك للعينة–مل حمض كبريتيك للعينة الخاوية)} \times \text{عيارية الحامض} \times \text{حجم المتقطر} \times ١٧ \times ١٠٠٠}{\text{مل متقطر} \times \text{حجم العينة المأخوذ للتقطير مل}}$$

وإذا أريد حساب تركيز أزوت الأمونيا مجم/لتر فيستبدل رقم ١٧ من المعادلة برقم ١٤ .

وقد تقدر الأمونيا بتقطير ١٠٠سم^{٣} من العينة مع ٣٥٠سم^{٣} ماء خالي التأين مع ١,٥

جم أوكسيد ماغنسيوم بحيث يجمع قرابة ٢٠٠سم٣ من المتقطر ، ويكمل إلى حجم معلوم (٢٥٠سم^{3}) بالماء خالي التأين ، يؤخذ منها ١٠سم^{3} في دورق مدرج ويكمل إلى ٤٠سم^{3} ثم يضاف إليها ٢سم^{3} من دليل نسلر ثم يكمل الحجم إلى ٥٠سم^{3}، اترك العينة ١٠ دقائق ثم قدر شدة الامتصاص على طول موجة ٤١٠ نانومتر .

$$\text{فيكون تركيز النشادر (مجم/لتر)} = \frac{\text{شدة الامتصاص} \times ١١٠ \times ٢٥٠}{١٠٠ \times ١٠} .$$

كما قد تقدر الأمونيا بإضافة ٢ مل دليل فينات (٦٢,٥ جم فينول تذاب في ٢٠ مل أسيتون وتخفف إلى ١٠٠ مل بالميثانول) مع ٢ مل محلول هيبوكلوريت (٠,٩ جم كلورين نشط في ١٠٠ مل) إلى المتقطر الحامضي وتخلط وتكمل إلى ٢٥ مل بالماء وتقدر الكثافة الضوئية على ٦٢٥ نانوميتر (اللون ثابت لمدة ٢٤ ساعة) .

٢ ـ النيتريت :

ناتج وسطي في نيترته Nitrification الأمونيا إلى نيترات وهو سام للأسماك . ويتفاعل النيتريت في وسط حامضي قوي مع السلفانيلاميد مكونًا مركب ثنائي الأزونيوم يتفاعل بدوره مع NED ليكون مركب أزو وملون قوي . ويجرى التقدير على العينات الطازجة أو المرشحة المجمدة لمنع تحويل البكتريا للنيتريت إلى أمونيا أو نيترات ، وقد يضاف للحفظ كذلك بدلا من التجميد ٤٠ مجم كلوريد زئبق $Hg\,Cl_2$ لكل لتر عينة .

الكيماويات :

١ ـ محلول سلفانيلاميد : أذب ٥ جم سلفانيلاميد $HN_2 . C_6H_4 . SO_4 . NH_2$ في مخلوط من ٥٠ مل حمض هيدروكلوريك مركز (١٢ مولر) و ٣٠٠ مل ماء مقطراً ، خفف إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر ، المحلول ثابت لعدة شهور .

٢ ـ محلول ن ـ نافثيل ـ إيثيلين دي أمين دي هيدروكلوريد (NED) : أذب ٠,٥٠ جم NED في ٥٠٠ مل ماء مقطرا ، واحفظه في إناء معتم في ثلاجة ، وهو ثابت لمدة شهر تقريبا .

٣ ـ محلول نيتريت قياسي : أذب ١,٠٦٤ جم نيتريت بوتاسيوم KNO_2 نقي جاف (على ١٠٥°م لمدة ساعة) في ماء مقطر مع ١ مل هيدروكسيد صوديوم ٥ مولر ، وخفف إلى ٢٥٠ مل ، فهذا المحلول يحتوي على ٧٠٠ مجم / لتر أزوت نيتريت ، ويجب حفظه في إناء زجاجي من البوروسيليكات في ثلاجة .

التقدير :

أضف ١,٠ مل محلول سلفانيلاميد إلى ٥٠ مل عينة ، واخلط ، وبعد ٢-٨ دقائق أضف ١,٠ مل محلول NED واتركه ١٠ دقائق ثم قس امتصاص الضوء للعينة والمحلول

القياسي ضد عينة خالية Blank على ٥٤٠ نانومتر ، واللون ثابت لمدة ساعتين . وللتحويل من النيتريت (NO_2) مجم / لتر إلى نيتروچين نيتريتي مجم / لتر نقسم على ٣,٢٩ . ويجب سرعة تقدير النيتريت في ظرف ٣ ساعات من جمع العينة وإلا تحفظ بكلوريد الزئبقيك .

٣ ـ نيترات :

النيترات هي أحد المغذيات الأساسية للبلانكتون النباتي في البيئة المائية ، وهي أقل المركبات الأزوتية غير العضوية سمية وهي أحد نواتج التحلل البكتيري الهوائي للمواد العضوية النتروچينية والتي تساعد على أكسدة الأمونيوم إلى نترات . وبعد ترشيح العينة مباشرة بعد جمعها يمكن حفظها في الظلام في ثلاجة لعدة ساعات . وإذا طالت فترة التخزين فيجب تجميد العينة بعد ترشيحها على -٢٠°م ، وبهذا يمكن حفظها عدة أسابيع، كما يمكن إضافة ٠,٨ مل حمض كبريتيك مركزا (١٨ مولر) لكل لتر عينة وقبل التقدير تعادل إلى PH ٧ .

للتقدير بطريقة سبكتروفوتومترية باستخدام الأشعة فوق البنفسجية :

Ultraviolet Spectrophotometric Method :

طريقة سريعة للعينات المحتوية تركيزات منخفضة من المادة العضوية :

الكيماويات :

١ ـ حمض هيدروكلوريك ١ مولر : بإضافة جزء من الحامض المركز (١٢ مولر) إلى ١١ جزءا من الماء المقطر .

٢ ـ محلول قياسي نيترات : يذاب ٠,٣٦١١ جم نيترات بوتاسيوم KNO_3 نقي مجفف على ١٠٥°م في ٢٥٠ مل ماء مقطرا . ويخفف ١٠٠ مل من هذا المحلول إلى لتر بالماء المقطر ، فيحتوي هذا المحلول النهائي على ٢ مجم / لتر أزوت نيتراتي .

التقدير :

يؤخذ ٥٠ مل من العينة المرشحة أو التي تم طردها مركزيا ، ويضاف إليها ١ مل حمض هيدروكلوريك ١ مولر ، ويخلط ويقاس امتصاص الضوء للمحلول القياسي والعينات ضد عينة خالية Blank (ماء) على طول موجة ٢٢٠ نانومتر باستخدام خلايا سليكا Silica Cu-vettes . ويصحح للتداخل من المادة العضوية الذائبة بقياس الامتصاص على ٢٧٥ نانومتر ، ويطرح ضعف هذه القراءة من القراءة على ٢٢٠ نانومتر . حضر منحنىً قياسياً من امتصاص الضوء لسلسلة من المحاليل القياسية .

ولتحويل الأزوت النتراتي (مجم / لتر) إلى نترات (NO_3) مجم / لتر نضرب في ٤,٤٣ . ويجب تقدير النترات في ظرف ساعتين من جمع العينة وإلا تحفظ بإضافة ١ سم٣ من

كلوريد الزئبقيك (محلول مشبع) لكل لتر من عينة الماء .

طريقة الاختزال الكمي إلى نيتريت Quantitative Reduction to Nitrite :

التقدير الدقيق صعب لتعقيد إجراءات قياسه نسبياً ، إذ يجب اختزال النيترات إلى نيتريت على عمود من الكادميوم والنحاس ، ثم يقدر النيتريت باستخدام طريقة السلفانيلاميد / NED سابقة الوصف .

الكيماويات :

١ ـ حمض هيدروكلوريك ٢ مولر : أضف ١٦,٧ مل حمض مركز إلى ٥٠ مل ماء مقطرا ، وأكمل إلى ١٠٠ مل .

٢ ـ محلول كبريتات نحاس : أذب ٢٠ جم كبريتات نحاس $Cu\ SO_4 . 5H_2O$ في لتر ماء مقطر .

٣ ـ محلول منظم : أذب ١٠٠ جم كلوريد أمونيوم $NH_4\ Cl$ + ٢٠ جم بورات صوديوم $Na_2\ B_4\ O_7$ + ١ جم Na_2 EDTA في ماء مقطر وأكمل إلى لتر .

٤ ـ برادة معدن الكادميوم : استخدام البرادة التي تمر من منخل سعة ثقوبه Mesh sieve ٢ م ويحتجزها منخل سعة ثقوبه ٠,٥ م .

٥ ـ محلول قياسي نيترات كما سبق تحضيره .

يعد عمود زجاجي قطره الداخلي ٨م ، ويغسل ٢٠ جم من برادة الكادميوم باستخدام ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ٢ مولر ، ثم يغسل بالماء المقطر ، وأضف إليها ٤٠ مل محلول كبريتات نحاس ، وقلب المحتويات حتى يختفي اللون الأزرق . سد العمود بصوف زجاجي من أسفل ، واملأه بالماء ثم بالكادميوم المعامل ، مع التأكد من عدم وجود فقاعات هواء محتبسة . اغسل العمود مرتين بالماء المقطر ٥٠ مل + ٥ مل محلولا منظما واضبط التدفق بمعدل ٢٥ مل / ٢٤٠ ± ١٠ ثوان .

التقدير :

ضع ٥٠ مل عينة أو محلول قياسي أو عينة خالية في مخبار مدرج ٥٠ مل ثم أضف ٥ مل محلول منظم . اخلط جيدا ثم ضع ٢٠ مل من هذا المحلول في العمود واسمح لها بالجريان في العمود ، ثم أضف باقي العينة إلى العمود واجمع عدة ملليترات تغسل بها القابلة (مخبار مدرج) ثم اجمع ٢٥ مل للتحليل للنيتريت كما سبق ذكره . وتعامل التجربة الخالية والمحلول القياسي بنفس الطريقة على نفس العمود . ولاحظ عدم جفاف العمود عند عدم استخدامه .

الأزوت النتراتي بطريقة حمض الفينول دي سلفونيك :

الجواهر الكشافة :

١ ـ Phenol Disulphonic Acid .

٢ ـ محلول أمونيا .

طريقة إعداد منحنى القياس :

١ ـ أذب ٣,٦٠٨٥ جم من نترات البوتاسيوم النقي في لتر من الماء المقطر ،كل ١سم^{٣} من هذا المحلول يحتوي على ٠,٥ جم أزوت نتراتي .

٢ ـ خذ ١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦ سم^{٣} من المحلول السابق ، وضع كل منها في دورق معياري سعة ١٠٠سم^{٣} وأضف إلى كل منها ٣٠سم^{٣} من محلول مورجان ، ثم أكمل بالماء المقطر . هذه المحاليل يكون تركيز الأزوت النتراتي بها ٠,٠٠٥ ، ٠,٠١ ، ٠,٠١٥ ، ٠,٠٢ ، ٠,٠٢٥ ، ٠,٠٣ جم في كل سم^{٣} أي ٥، ١٠، ١٥، ٢٠، ٢٥، ٣٠، جزء في المليون من الأزوت النتراتي .

٣ ـ خذ ٣٠سم^{٣} من محلول مورجان في دورق مخروطي سعة ١٠٠سم^{٣} وأكمل بالماء المقطر .

٤ ـ خذ ٥سم^{٣} من كل من المحاليل القياسية السابقة وكذا من محلول مورجان مع الماء المقطر كل في كأس جاف ، ثم أضف إلى كل منها ٢سم^{٣} من محلول PH. Disulphonic Acid واترك الكأس يبرد لمدة ١٥ دقيقة بعد ذلك أضف إلى كل كأس ٥سم^{٣} من الماء المقطر مع الرج الخفيف وبرد الكأس بماء الصنبور ، بعد ذلك أضف إلى كل كأس ١٠سم^{٣} من محلول الأمونيا مع الرج الخفيف والتبريد بماء الصنبور ثم أضف ٣سم^{٣} من الماء المقطر ليصير مجموع حجوم السوائل الموجودة في الكأس ٢٥سم^{٣} . امزج جيدا بالمحرك وعندما يبرد المحلول قدر كثافة اللون المتكون من كل أنبوبة مستعملا (Blue Filter) (٤٣٥ـ ٤٨٠ ميكرون) ثم سجل الأرقام في جدول .

٥ ـ اطرح الرقم الذي سجله البلانك من أرقام التركيزات المختلفة التي حصلت عليها . كرر العملية أكثر من مرة ثم خذ متوسط القراءات وارسم منها بعد ذلك منحنى القياس .

٦ ـ أجر ما سبق في خطوة رقم (٤) على عينات الماء واستخرج تركيز النترات بها من المنحنى القياسي .

٤ ـ النيتروچين العضوي :

مصدر هام للنيتروچين للبلانكتون النباتي والبكتريا ، وتخرجه الأسماك (أساساً في صورة يوريا) ، ويوجد في الماء في صور جزيئية وذائبة ؛ لذلك يجرى التقدير على عينات

غير مرشحة (للنيتروچين العضوي الكلي) ، وعينات مرشحة (للنتروچين الذائب الكلي)، وعلى المادة المتجمعة على ورق الترشيح GF / C من ترشيح حجم معلوم من العينة (للنيتروچين العضوي الجزيئي الكلي). العينات المتطلبة ترشيح يجب ترشيحها مباشرة عقب جمعها ؛ (لأن النيتروچين العضوي يتحول إلى أمونيا) ، وتحفظ بالتجميد أو بإضافة ٠,٨ مل حمض كبريتيك مركز / لتر عينة إن لم تحلل في الحال .

ويتكسر الأزوت العضوي بالهضم في بيرسلفات بوتاسيوم / حمض كبريتيك إلى أمونيا حيث تقدر الأمونيا في المهضوم بطريقة الفينول / هيبوكلوريت .

الكيماويات :

١ ـ حمض كبريتيك مركز نقي جدا.

٢ ـ جسيمات مانعة للفرقعة . وتغسل في حمض كبريتيك مركز وماء مقطر قبل استخدامها .

٣ ـ بيرسلفات بوتاسيوم $K_2S_2O_8$ نقية جدا .

٤ ـ هيدروكسيد صوديوم ١٠ مولر : أضف ٤٠٠ جم صودا كاوية حبيبات للتر ماء مقطرا .

٥ ـ حمض كبريتيك ٤ مولر : أضف بحرص ١١١ مل حمض مركزا إلى ٣٠٠ مل ماء وبرد ، وأكمل إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر .

٦ ـ محلول أحمر ميثيل : يحضر المحلول في كحول إيثايل يحتوي ٠,١ جم / ١٠٠ مل .

٧ ـ المحاليل المطلوبة في طريقة الفينول / هيبوكلوريت .

٨ ـ محلول يوريا قياسي : أذب ٢,١٤٥ جم يوريا $NH_2.CO.NH_2$ في لتر ماء مقطراً فيحتوي هذا المحلول ١٠٠٠ مجم / لتر من أزوت اليوريا .

التقدير :

ضع ٢٥ مل عينة في دورق مخروطي سعة ١٥٠ مل ، ثم أضف ١ مل حمض كبريتيك مركزا ومجموعة من الحبيبات مانعة الفرقعة . أجر نفس العملية على ماء مقطر (عينة خاوية) وعلى المحلول القياسي . اغل على سخان كهربائي حتى تظهر الأبخرة البيضاء لثالث أوكسيد الكبريت ، ثم أزل الدوارق من على السخان وأضف ١ جم بيرسلفات بوتاسيوم لكل دورق مع التأكد من خلط بقايا العينة كلها مع البيرسلفات بالتقليب ، ثم تسخن الدوارق بشدة لمدة ١٠ دقائق (ليس أكثر) . اتركها تبرد ، ثم أضف ١٥ مل ماء مقطرا ، ثم انقل إلى دورق معياري سعة ٥٠ مل (سخن بلطف إذا لزم

الأمر لإذابة المهنوم في الماء) واغسل الدورق المخروطي ٢-٣ مرة بماء مقطر لتمام نقل العينة . أضف نقطة من محلول أحمر الميثيل ، ثم أضف صودا كاوية ١٠ مولر حتى يروق المحلول . نقط بحمض الكبريتيك ٤ مولر حتى يتحول المحلول إلى الأحمر . أكمل العينة إلى ٥٠ مل بالماء المقطر .

قدر الأمونيا بطريقتي الفينول و هيبوكلوريت سابقتي الذكر سواء للماء العذب أو للماء المالح حسب العينة ، مع طرح الأمونيا الموجودة أصلا في العينة من التقدير النهائي للحصول على النيتروچين العضوي فقط .

٥ ـ النيتروچين الكلي :

تؤكسد كل المركبات النيتروچينية العضوية وغير العضوية بالبوتاسيوم بيرسلفات في محلول قلوي إلى نيترات ثم تختزل النيترات إلى نيتريت الذي يقدر ضوئيا . فيؤخذ ١٥ مل عينة متعادلة مع ١٠ مل محلول أكسدة (٥ جم بوتاسيوم بيرسلفات تذاب في صودا كاوية ٠,١٥ مولر وتخفف بالصودا إلى ٥٠٠ مل) . سخن نصف ساعة على ١٢٥°م في أتوكلاف وأضف ٠,٥ مل حمض كبريتيك ١,٢٥ مولر والمحلول ساخن واخلط أثناء التبريد . انقل إلى دورق معياري ٥٠ مل وأضف نقطة دليل أزرق برومو ثيمول (٠,٠٥٪ في إيثانول / ماء ٢٠/٨٠) وعادل بالصودا الكاوية ٠,١٥ مولر وخفف إلى ٥٠ مل وأكمل كما في تقدير النيترات .

٦ ـ نيتروچين كلداهل :

يشمل نيتروچين الأمونيا والنيتروچين العضوي ولا يشتمل على نيتروچين النيترات والنيتريت . يتحول النيتروچين العضوي بالهضم بحمض الكبريتيك (في وجود عامل مساعد من كبريتات البوتاسيوم وكبريتات النحاس) إلى نيتروچين أمونيومي يقطر من المحلول القلوي ويمتص في وسط حامضي لتقدير الأمونيا ضوئيا فيهضم حجم مناسب (٢٥ مل) من الماء في ٤ مل حمض كبريتيك مركزا مع ٦ جم كبريتات بوتاسيوم و ١ مل محلول كبريتات نحاس (٢٥ جم / لتر ماء) في دورق كلداهل حتى الحصول على لون أخضر فاتحا ، وتخفف بالماء بعد أن تبرد ، أضف ١٥ مل صودا كاوية ١٠ مولر ، وقطر ثم قدر الأمونيا ضوئيا كما سبق .

ب ـ الفوسفور :

يرتبط تركيز الفوسفور في المياه ارتباطا شديدا بالإنتاج الأولى لمعظم المياه العذبة .

١ ـ الفوسفور الفعال الذائب Dissolved Reactive Phosphorus :

وهو مقياس تقريبي للفوسفور الذائب المتوفر لنمو البلانكتون النباتي ويجب سرعة إجراء التقدير بعد ترشيح العينة ، أو تحفظ العينة بالتجميد ، أو بإضافة ٤٠ مجم كلوريد زئبق ،

أو ٥ مل كلوروفورم لكل لتر عينة ولايفضل إطالة التخزين في أواني بولي إيثيلين ، بل الأفضل أواني من زجاج بورسيليكات. وفي المحلول الحامضي تتفاعل الفوسفات مع الموليبدات لتكوين موليبدو- حمض الفوسفوريك ثم يختزل للمعقد أزرق اللون (موليبدنم) فيقدر اللون سبكتر وفوتومتريا . والفوسفات المتفاعلة هنا تتكون من الأورثوفوسفات ومركبات عضوية سهلة التحلل أي أنها تشير إلى الفوسفور الفعال الذائب .

المحاليل :

١ ـ محلول حمض كبريتيك أنتيموني: اخلط ٥٣,٣ مل حمض كبريتيك مركزا مع ٥٠٠ مل ماء مقطراً ثم برد . أذب ٠,٧٤٨ بوتليوم أنتيمونيل طرطرات $K (SbO) C_4 H_4 O_6 . \frac{1}{2} H_2O$ في محلول حمض الكبريتيك، وخفف إلى لتر بالماء المقطر واحفظ في ثلاجة .

٢ ـ محلول موليبدات : أذب ١٠,٨٣٩ جم موليبدات صوديوم $Na_2 Mo O_4 . 2H_2O$ في ٥٠٠ مل ماء مقطرا ، وخفف إلى لتر بالماء المقطر واحفظ في ثلاجة .

٣ ـ محلول حمض كبريتيك ١,٨ مولر : اخلط ١٠٠ مل حمض مركز مع ٥٠٠ مل ماء مقطرا خفف إلى لتر .

٤ ـ حمض أسكوربيك .

٥ ـ مخلوط دليل أ : اخلط ٢٥ مل من كل من (١) و (٢) مع ١٠ مل من (٣) ثم أضف ٠,٢ جم حمض أسكوربيك وخفف إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ، يجب تحضير هذا المحلول طازجا يوما بيوم .

٦ ـ محلول فوسفات قياس : أذب ٠,١٧٥٧ جم بوتاسيوم هيدروچين أورثوفوسفات $KH_2 PO_4$ نقي جاف في ماء مقطر مع بضع نقط من الكلوروفورم كمادة حافظة وخفف إلى لتر، فيحتوي هذا المحلول على ٤٠ جم فوسفور/ لتر فوسفات ويجب حفظه في ثلاجة.

التقدير :

خذ ٢٥ مل عينة + ٥ مل مخلوط دليل أ واتركها ١٥ دقيقة لإحداث اللون ثم قس امتصاص الضوء للمحلول القياسي والعينات ضد عينة خاوية على ٨٨٢ نانومتر ، اللون ثابت لمدة ساعتين .

ويمكن زيادة حساسية الطريقة بالاستخلاص والتركيز للون في هكسانول وفي هذه الحالة يؤخذ ١٠٠ أو ٢٠٠ مل عينة مع كميات أكبر من مخلوط دليل أ (٢٠ أو ٤٠ مل على الترتيب) وتستخلص العينة والدليل في قمع فصل بالهكسانول (١٠ مل) والرج الشديد لمدة دقيقة ، وتترك لفصل الطبقات وتصرف الطبقة السفلى ، وتنقل الطبقة العضوية إلى أنبوبة طرد مركزي ١٠ مل مدرجة ويغسل جوانب قمع الفصل بالبروبانول وتكمل

ويمكن زيادة حساسية الطريقة بالاستخلاص والتركيز للون في هكسانول وفي هذه الحالة يؤخذ ١٠٠ أو ٢٠٠ مل عينة مع كميات أكبر من مخلوط دليل أ (٢٠ أو ٤٠ مل على الترتيب) وتستخلص العينة والدليل في قمع فصل بالهكسانول (١٠ مل) والرج الشديد لمدة دقيقة ، وتترك لفصل الطبقات وتصرف الطبقة السفلى ، وتنقل الطبقة العضوية إلى أنبوبة طرد مركزي ١٠ مل مدرجة ويغسل جوانب قمع الفصل بالبروبانول وتكمل العينة في الأنبوبة إلى ١٠ مل وتطرد مركزيا على ٣٠٠٠ لفة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق . وتؤخذ الطبقة العليا لقراءة الامتصاص الضوئي على ٦٩٠ أو ٨٨٠ نانومتر .

٢ ـ الفوسفور الكلي Total Phosphorus :

يوجد الفوسفور في الماء في صور مختلفة ذائبة وجزيئية ، فيجرى تقديره في العينة المخلوطة جيداً غير المرشحة (فوسفور كلي) أو في العينة المرشحة (فوسفور ذائب كلي) ، وفي المادة المتبقية على ورق الترشيح (فوسفور جزيئي) . العينات التي سترشح يجب ترشيحها مباشرة عقب جمعها ، ثم تحفظ العينات في أواني زجاج بوروسيليكات، أو تجمد في أواني بولي إيثين .

وللتقدير يحول فوسفور العينة إلى فوسفور غير عضوي ذائب بالهضم في مخلوط حمض كبريتيك وبوتاسيوم بيرسلفات ، ثم يقدر الفوسفور في المهضوم بالطريقة السابقة (لتقدير الفوسفور الفعال الذائب) .

الكيماويات :

١ ـ بوتاسيوم بيرسلفات عالي النقاوة .

٢ ـ الكيماويات الموصوفة في تقدير الفوسفور الفعال الذائب .

٣ ـ محلول هضم : أذب ٦ جم بوتاسيوم بيرسلفات في ٨٠ مل ماء مقطرا + ١٠ مل حمض كبريتيك ١,٨ مولر وخفف إلى ١٠٠ مل ، يحضر يوميا .

٤ ـ مخلوط دليل ب : اخلط ٢٥,٠ مل من كل من محلول حمض كبريتيك – أنتيموني ومحلول موليبدات مع ٠,٢ جم حمض أسكوربيك وأكمل إلى ١٠٠ مل بماء مقطر .

التقدير :

ضع ٢٥ مل عينة في دورق مخروطي ١٠٠ مل ثم ٥ مل محلول هضم ، غط قمة الدورق بورق ألومونيوم ، وعقم في أوتوكلاف Autoclave لمدة ٣٠ دقيقة على ١٥ رطل / بوصة مربعة (P. S.I) . برد على حرارة الغرفة وأضف ٥ مل مخلوط دليل ب . اترك العينات ١٥ دقيقة ثم اطردها مركزيا على ٣٠٠٠ لفة في الدقيقة (r. p. m) لمدة ١٠ دقائق. قس الامتصاص الضوئي للعينات والمحاليل القياسية ضد عينة خاوية على ٨٨٢ نانومتر . ويمكن

تحسين حساسية الطريقة بالاستخلاص بالهكسانول كما سبق ذكره في تقدير الفوسفور الفعال الذائب .

وتستخدم نفس الطريقة مع ماء البحر وتحسن حساسيتها بالاستخلاص بالإيزوبيوتانول (بدلا من الهكسانول مع الماء العذب) .

ولقياس التلوث الفوسفاتي للمياه والذي ينشأ عن المنظفات الصناعية فيقدر الفوسفات غير العضوي (والذي يعتبر مؤشرا كذلك للتلوث بالفوسفات المكثفة المستخدمة في مياه التبريد) فتقدر لذلك الفوسفات (أورثوفوسفات) بأخذ ١٠سم^{3} من العينة في دورق مع ٣٠سم^{3}من ماء خالي التأين ، يضاف إليها ٨ سم^{3} من مزيج (١٠٠سم^{3} من محلول حمض كبريتيك ٥ عياري ، ٣٠سم^{3} من محلول موليبدات أمونيوم ٤ ٪ ، ٦٠سم^{3} من حمض أسكوربيك ٢,٦ ٪ ، ١٠سم^{3} من محلول طرطرات بوتاسيوم أنتيمون ٠,٢٨ ٪) ، يكمل الحجم الكلي إلى ٥٠سم^{3} بالماء خالي التأين ثم يترك لمدة ٢٠ دقيقة وتقاس شدة الامتصاص على طول موجة ٨٨٠ نانومتر مقابل ماء خالي الأيونات ، فيكون تركيز الأورثوفوسفات (مجم/لتر) = $\frac{\text{شدة الامتصاص} \times ٣٥,٨٨}{\text{حجم العينة}}$.

وهذه الطريقة خاصة بتقدير الأورثوفوسفات ، ولقياس تركيز الفوسفات الكلية فيتم تحويل البيرو والميتافوسفات إلى أورثوفوسفات في وسط حامضي وحرارة .

ويتفاعل الفوسفور مع الموليبدات والفانادات في محلول حمض نيتريك ويعطي معقداً ملوناً يقاس ضوئيا .

فيؤخذ ٠,٢ مل عينة مع ٢,٠ مل حمض ثالث كلور الخليك Trichloroacetic Acid تركيز ١,٢ مول / لتر ، ويخلط ويترك ١٠ دقائق ويطرد مركزيا ١٠ دقائق . انقل ١ مل من الرائق (أو ١ مل من هذا الحمض للعينة الخاوية)+ ١ مل من محلول الفانادات (فانادات أمونيوم ٢١ ملي مول / لتر في حمض نيتريك ٠,٢٨ عياري) + ١ مل محلول موليبدات أمونيوم (٤٠ ملي مول / لتر في حمض كبريتيك ٢,٥ عياري) واخلط واترك ١٠ دقائق، ثم قس الكثافة الضوئية على طول موجة ٤٠٥ نانومتر فيكون تركيز الفوسفور .

مجم / لتر = الكثافة الضوئية × ٤٢٢

ملي مول / لتر = الكثافة الضوئية × ١٣,٦ .

كما يمكن تقدير الفوسفور بتفاعله مع حمض الموليبديك لتكوين معقد فوسفوموليبدات الذي يختزل بحمض أمينونافثول سلفونيك للمعقد موليبدنم الأزرق الذي يقاس ضوئيا.

خذ ٥ مل عينة + ٥مل دليل موليبدات (٢٥جم موليبدات أمونيوم في ٤٠٠مل ماء +

٥٠٠ مل حمض كبريتيك ١٠ عياري وأكمل إلى لتر بالماء) ، واخلط ثم أضف ٢ مل محلول حمض أمينونافثول سلفونيك (٠,٥ جم من هذا الحمض + ٣٠ جم صوديوم بيسلفيت $NaH\ SO_3$ + ٦ جم صوديوم سلفيت $Na_2\ SO_3$ وأكمل إلى ٢٥٠ مل ويترك ليلة ويرشح ويحضر كل أسبوعين) ، واخلط ثم أكمل إلى ٥٠ مل . عد عينة خاوية باستخدام الماء المقطر بدلا من العينة ، وأكمل كما في العينة . عد محلولا قياسيا للفوسفور (٠,٤٣٨٩ جم $KH_2\ PO_4$ في ماء + ١٠ مل حمض كبريتيك ١٠ عيارى وأكمل بالماء إلى لتر ، خذ منه ١٠ مل وخففهم إلى ٥٠ مل ، يحتوي المليلتر منها ٠,٠٢ مجم فوسفور) ، وخذ منه ٥ مل وأجر عليها ما جرى مع العينة والعينة الخاوية . اتركهم ١٠ دقائق ثم قس اللون على طول موجة ٦٥٠ نانومتر .

١٤ ـ العناصر الكبرى :

أ ـ الكالسيوم :

يقدر الكالسيوم باستخدام محلول O – Cresolphthalein Complexone الذي يكون لونا بنفسجيا مع الكالسيوم في وسط قاعدي . فيؤخذ ٠,٥ مل من العينات (وكذلك من المحلول القياسي تركيز ٢,٥ ملي مول / لتر أي ١٠٠ مجم / ١٠٠٠ مل) ويضاف إلى كل من العينات والمحلول القياسي والعينة الخاوية على الترتيب ١ مل من محلول منظم PH ١٠,٧ من 2- Amino -2- Methylpropan -1- ol تركيز ٣,٥ مول / لتر ، ثم ١ مل من مخلوط الدليل الملون (المكون من أورثوكريزول فثالين كومبليكسون ٠,١٦ ملي مول / لتر مع 8- Hydroxyquinaline تركيز ٦,٨٩ ملي مول / لتر مع حمض هيدروكلوريك تركيز ٠,٠٦ مول / لتر تقريباً) . اخلط واقرأ الامتصاص الضوئي للعينة (أ) والمحلول القياسي (ب) ضد العينة الخاوية بعد ٥–٥٠ دقيقة على طول موجة ٥٧٠ نانومتر . فيكون تركيز

الكالسيوم في العينة = $\frac{أ \times ٢,٥}{ب}$ ملي مول / لتر

= $\frac{أ \times ١٠٠}{ب}$ مجم / لتر .

كما يمكن استخدام الدليل الملون من أزرق ميثيل ثيمول Methylthymol Blue تركيز ٨٠ مجم / لتر مع 8- Hydroxyquinaline تركيز ١,٦ جم / لتر ، والمكون الأخير لإزالة التداخل من الماغنسيوم مع استعمال ٠٥, مل من العينة أو المحلول القياسي مع ٢,٥ مل دليلا ملونا مع ٢,٥ مل من الدليل القلوي والقراءة على طول موجة ٦١٢ نانومتر والحساب بنفس الطريقة .

وقد يقدر الكالسيوم بترسيبه بأوكسالات الأمونيوم في صورة أوكسالات كالسيوم ، ثم إذابته في حمض كبريتيك ومعايرته ببرمنجنات البوتاسيوم . فيؤخذ ٢٠–١٠٠ مل عينة بالضبط في كأس ٢٥٠ مل مع إضافة ١٠ مل محلول أوكسالات أمونيوم مشبع + نقطتان

من دليل أحمر ميثيل (٠,٥ جم في ١٠٠ مل كحول ٩٥ ٪) . أضف هيدروكسيد أمونيوم مخففة (٢٠ ٪) تدريجيا ثم حمضه بنقط من حمض الخليك (٢٠ ٪) حتى يتلون المحلول بنفسجي باهت (PH ٥,٠) . سخن لنقطة الغليان ، ثم اتركه على حرارة الغرفة على الأقل ٤ ساعات والأفضل ليلة . رشح خلال ورقة ترشيح واتمان رقم ٤٢ ، واغسله بالماء حتى يصير الراشح خاليا من الأوكسالات . اثقب ورقة الترشيح على الكأس التي ترسبت فيه أوكسالات الكالسيوم واغسل الراسب بحمض كبريتيك مخفف (٢٠ ٪) ثم بماء مقطر ساخن ثم عاير (ومحتويات الكأس ساخن) ببرمنجنات البوتاسيوم ٠,٠١ عياري حتى ظهور أول لون بنفسجي ثابت . ١ مل من هذه البرمنجنات تكافئ ٠,٢ مجم كالسيوم فيكون تركيز الكالسيوم مجم / لتر = $\frac{\text{حجم البرمنجنات} \times ٠,٢ \times ١٠٠٠}{\text{حجم العينة}}$.

ب ـ ماغنسيوم :

يقدر الماغنسيوم ضوئيا بالمعاملة بالكالماچيت Calmagite في وسط قاعدي من EGTA التي تعزل تداخل الكالسيوم ، فيؤخذ ٠٥, مل من كل من العينة ، أو المحلول القياسي (كبريتات ماغنسيوم ٢٥ مجم / لتر أي ١,٣ ملي مول / لتر) ، أو العينة الخاوية (ماء مقطر) ، وإلى كل منها يضاف ١,٢٥ مل من كل من الدليل الملون (كالماچيت ١٦٠مجم / لتر) والدليل القاعدي (PH ١١ من EGTA ٧٠ مجم / لتر) وينتظر دقيقة ، ويقاس الامتصاص الضوئي على طول موجة ٥٢٠ نانومتر .

ويقدركذلك الماغنسيوم بترسيبه في صورة فوسفات أمونيوم ماغنسيوم في وسط قلوي مزال منه الكالسيوم والحديد ثم إذابة الراسب في حمض ، وتقدير الفوسفور ضوئيا ومنه يحسب الماغنسيوم فيؤخذ ١٠ مل عينة + نقطة دليل أحمر ميثيل (٠,٥ جم في ١٠٠ مل كحول ٩٥ ٪) وعادل إذا لزم الأمر بهيدروكسيد الأمونيوم (١٠ ٪) . أضف ١ مل أوكسالات أمونيوم المشبعة وأكمل الحجم إلى ١٣ مل بالماء واخلط واتركه ليلة . اطرد مركزيا ١٠ دقائق وأهمل الراسب، وانقل ١مل من الرائق العلوي إلى أنبوبة طرد مركزي + ٣ مل ماء + ١ مل فوسفات أمونيوم (٢ ٪) + ٢ مل هيدروكسيد أمونيوم (١٠ ٪) . اخلط واتركه ليلة . اطرد مركزيا ٧ دقائق ، وأهمل الرائق ثم اخلط الراسب مع ٥ مل هيدروكسيد أمونيوم (١٠ ٪) واطرد مركزيا ثانية ٧ دقائق ، وأهمل الرائق وجفف الراسب بوضع الأنابيب في إناء ماء ساخن. أضف ١مل حمض هيدروكلوريك (٠,١ عياري) + ٥ مل ماء لإذابة الراسب ثم أضف ١ مل حمض موليبديك (أذب ٢٥ جم موليبدات أمونيوم في ٣٠٠ مل ماء بدون تسخين ، خفف ٣٧ مل حمض كبريتيك إلى ٢٠٠ مل ماء ثم أضفها إلى محلول موليبدات الأمونيوم واحفظها في إناء بني اللون) ثم ٠,٥ مل هيدروكينون (٢ ٪ مع نقطة حمض كبريتيك لكل ١٠٠ مل) ثم ٠,٥ مل كبريتيت

صوديوم (١٠ ٪ يحضر أسبوعيا) ، اخلط واتركه نصف ساعة ثم اقرأ الكثافة الضوئية (ضد ماء كعينة خاوية) للعينات والمحلول القياسي (أذب ٠,٤٣٨٩ جم بوتاسيوم هيدروجين فوسفات KH_2PO_4 في ماء وأكمل إلى لتر فيكون فيه كل مل = ٠,١ مجم فوسفور = ٠,٠٧٨٤ مجم ماغنسيوم) على طول موجة ٦٥٠ نانومتر .

١٥ ـ المعادن الثقيلة Heavy Metals :

تركيزاتها في المياه الطبيعية عادة ضئيلة ، مما يجعل تحليلها صعبا خاصة وأن التقديرات خطواتها عديدة مما يخفض من دقة التقدير ، إلا أن مقياس الطيف الضوئي ذي اللهب لقياس الامتصاص الذري Atomic Absorption Flame Spectrophotometry (AAS) يستخدم بخطوات أقل من الطرق الوزنة أو الحجمية أو اللونية ،كما أنه يقدر المعادن الثقيلة كلها في العينة فهو المفضل لهذه التحاليل . إلا أن المهم بالنسبة للسمك هو إذا ما كانت المياه ملوثة بتركيزات مميتة من هذه المعادن وعليه فالطرق الضوئية تكفي للحساسية المطلوبة لهذه التقديرات .

ويجب الحرص أثناء التقديرات لخفض تلوث العينات ؛ لذلك تجمع العينات في أواني بولي إيثيلين سبق غسلها بحمض هيدروكلوريك مركز أو حمض نيتريك تركيز ٥٠ ٪ ثم بماء مقطر ثم بالعينة ذاتها مرتين قبل ملئها بالعينات . ولحفظ العينات من امتصاص البكتريا أو ترسيبها على جدران الأواني ، يضاف ٥ مل حمض نيتريك مركزا لكل لتر عينة. وترشح العينات قبل حفظها إذا كان المستهدف قياس تركيزات المعادن الذائبة . وقد تتطلب العينات أحيانًا الهضم خاصة إذا احتوت طمياً .

وفي دراسة على مياه الخليج العربي عام ١٩٨٠ لبعض العناصر وجد أعلى تركيزفي الماء كان للزرنيخ يليه النحاس ، بينما أعلى تراكم كان في المحار من الخارصين يليه النحاس ، وذلك كالتالي :

العنصر	تركيزه في الماء ميكروجرام/لتر	تركيزه في أنسجة المحار ميكروجرام/كجم	معامل التراكم الحيوي
زرنيخ	٢,٠٠٠	٢٥٠٠٠	١٢٥٠٠
نحاس	٠,٥١٠	٧١٠٠	١٣٩٢١
خارصين	٠,٣٤٠	٣٦٠٠٠	١٠٥٨٨٢
زئبق	٠,١٦٠	١٥٠	٩٣٧٥
رصاص	٠,٠٧٦	١٢٠	١٥٧٩
كادميوم	٠,٠٢٠	٥٣	٢٦٥٠

ولتقدير المعادن الثقيلة يجرى هضم العينة (٤٠ مل ماء أو ١ جم رواسب) في ١٠ مل محلول حامض (هيدروكلوريك مركز / نيتريك مركز ١/٣ بالحجم) على حمام مائي ٩٠°م لمدة نصف ساعة (إذا كانت العينة رواسب فتخفف بالماء ٥٠ مل) ثم حلل .

أما إن كانت العينة أنسجة بيولوجية فيؤخذ ٠,٥ - ١ جم مادة جافة أو ١-٥ جم عينة طازجة مع ٣ نقط محلول ص كل (٣٠٪) و٨ مل محلول حامض (بيركلوريك / نيتريك ٢/١٠ بالحجم) وسخن على ٧٠°م لمدة ١٢ ساعة على حمام مائي . أضف ٣ نقط محلول كلوريد هيدروكسيل أمونيوم (٥٠٪) ثم حلل .

أ - النحاس Copper :

يتم فصله وتقدير لونه ضوئيا في صورة دي إيثيل دي ثيوكاربامات النحاس على PH ٨,٥ في وجود ملح EDTA . فالنحاس يتفاعل مع محلول دي إيثيل دي ثيوكاربامات في وسط قلوي منتجا لونا أصفر إلى بني طبقاً لتركيز المعدن . واللون ذائب في المذيبات العضوية ؛ لذا ينقل من المحلول المائي باستخدام رابع كلوريد الكربون ويقاس لونه .

المحاليل :

١ - دي إيثيل دي ثيوكاربامات الصوديوم $(C_2H_5)_3\ NCS_2\ Na$: أذب ١ جم من الملح في ماء ، وخفف إلى ١٠٠ مل ، ورشح واحفظ في ثلاجة ويحضر أسبوعيا .

٢ - محلول ملح سيترات حمض EDTA : أذب ٢٠ جم $(NH_4)_2\ HC_6\ H_5\ O_7$ + ٥ جم Na_2 EDTA في ماء وخفف إلى ١٠٠ مل ، وأذل آثار النحاس بإضافة ٠,١ مل محلول كاربامات ، واستخلص بمقدار ١٠ مل رابع كلوريد الكربون وكرر الاستخلاص حتى يصير رابع كلوريد الكربون عديم اللون .

٣ - هيدروكسيد أمونيوم ٦ عياري : خفف ٣٤٩,٧ مل أمونيا إلى لتر بالماء .

٤ - أزرق ثيمول ٠,١ ٪ : أذب ٠,١ جم في ماء مع كفاية من ص أ يد ٠,١ عياري لتغير اللون للصبغة إلى الأزرق وخفف إلى ١٠٠ مل .

٥ - حمض كبريتيك ٢ عياري : خفف ٥٦,٨ مل حمض نقي إلى لتر .

٦ - رابع كلوريد كربون معاد تقطيره .

٧ - محلول نحاس قياسي : أذب ٠,٢٥ جم سلك أو رقائق نحاس نقي في ١٥ مل حمض نيتريك في دورق مخروطي ، وغط فوهة الدورق بزجاجة ساعة ، ودفئ لإتمام الذوبان . واغل ثم برد وخفف إلى ٢٥٠ مل (محلول أ) . خفف ٢٥ مل من محلول أ إلى ٢٥٠ مل (١ مل = ٠,١ مجم) (محلول ب) . ولعمل محلول قياسي للعمل خفف ٥ مل من محلول (ب) إلى ٢٥٠ مل بحمض كبريتيك ٢ عياري (١ مل = ٢ ميكروجرام نحاس) وكبديل يمكن إذابة ٠,٣٩٢٨ جم كبريتات نحاس $Cu\ SO_4 . 5H_2O$

في ماء وأكمل إلى لتر ، ثم خفف منه ٢ مل إلى ١٠٠ مل قبل الاستخدام (١ مل = ٢ ميكروجرام نحاس) .

التقدير :

بماصة انقل ٢٥ مل إلى قمع فصل + ١٠ مل سترات EDTA ثم نقطتان من دليل أزرق ثيمول ونقط من هيدروكسيد أمونيوم ٦ عياري حتى يتحول اللون إلى الأخضر أو الأزرق المخضر . برد ثم أضف ١ مل محلول كاربامات + ١٥ مل رابع كلوريد كربون . رج بشدة دقيقتين ، واترك لفصل الطبقات واسحب طبقات رابع كلوريد الكربون ، ورشحه على قطن إلى أنبوبة أو دورق بسدادة ، وقس اللون على ٤٠٠ نانومتر للعينة والمحلول القياسي ضد عينة خاوية أجر عليها نفس الخطوات .

ب ـ الزنك Zinc :

يتوقف التقدير على عزل العناصر الأخرى في صور كبريتيد أو معقد الفانيتروزبيتا نافثول، أو معقد دي ميثيل جليوكسيم ، ثم استخلاص الزنك كزنك دي ثيونات يقدر لونه ضوئيا .

الكيماويات :

١ ـ حمض نيتريك مركزاً .

٢ ـ حمض كبريتيك مركزاً .

٣ ـ أمونيا مركزة .

٤ ـ كلوروفورم معاد تقطيره .

٥ ـ محلول دي ثيزون Diphenylthiocarbazone : أذب ٣٠ مجم دي ثيزون في ٢ مل أمونيا + ١٠٠ مل ماء واستخلص برابع كلوريد الكربون حتى تصير طبقة المذيب رائقة خضراء فاتح . اهمل طبقة المذيب ، ورشح الطبقة المائية خلال ورق ترشيح عديم الرماد مغسول وحضره أولا بأول .

٦ ـ رابع كلوريد كربون معاد تقطيره .

٧ ـ حمض هيدروكلوريك ٠,٠٤ عياري .

٨ ـ محلول زنك قياسي : ٠,٥ جم حبيبات زنك نقي في حمض هيدروكلوريك مخفف وخفف إلى لتر . وللعمل خفف ١٠ مل منه إلى لتر بحمض هيدروكلوريك ٠,٠٤ عياري (١ مل = ٥ ميكروجرام زنك) .

٩ ـ محلول كبريتات نحاس : أذب ٨ جم $CuSO_4 . 5H_2O$ في ماء وخفف إلى لتر (١ مل = ٢ مجم نحاس) .

١٠ ـ محلول سترات أمونيوم : أذب ٢٢٥ جم $(NH_4)_2 HC_6 H_5 O_7$ في ماء ، وأضف نقطا قليلة من دليل أحمر فينول PH ٧,٤ ، وعادل بالأمونيا حتى يتغير اللون بوضوح . أضف ٧٥ مل زيادة وأكمل إلى ٢ لتر ، واستخلص هذا المحلول في الحال قبل الاستخدام كالتالي :

أضف زيادة من الدي ثيزون ، واستخلص برابع كلوريد الكربون حتى تصير طبقة المذيب خضراء فاتحة رائقة، وأزل الزيادة من الدي ثيزون بالاستخلاص المتكرر بالكلوروفورم، ثم أخيرا استخلص مرة واحدة برابع كلوريد الكربون (أزل الدي ثيزون تماما وإلا يفقد الزنك عند فصل الكوبلت والنيكل) .

١١ ـ محلول دي ميثيل جليوكسيم : أذب ٢جم في ١٠مل أمونيا + ٢٠٠-٣٠٠ مل ماء ويرشح ويخفف إلى لتر .

١٢ ـ محلول الفانيتروزبيتا نافثول : أذب ٠,٢٥ جم في كلوروفورم وخفف إلى ٥٠٠ مل .

التقدير :

يؤخذ حجم من العينة + نقطتان من دليل أحمر ميثيل + ١ مل محلول كبريتات نحاس . عادل بالأمونيا لو لزم الأمر ، وأضف حمض هيدروكلوريك لجعل المحلول ٠,١٥ عياري تقريبا بالنسبة لهذا الحمض (٠,٥مل هيدروكلوريك لكل ٥٠ مل محلول تقريبا) . مرر H_2S في المحلول حتى تمام الترسيب ، ورشح على ورق واتمان رقم ٤٢ على كأس ٢٥٠ مل ، واغسل الدورق وورق الترشيح ٣-٤ مرات بكميات بسيطة من الماء . اغل الراشح بهدوء حتى تنعدم رائحة كبريتيد الهيدروچين ، ثم أضف ٥ مل ماء بروم مشبع ، وأكمل الغليان حتى يطرد البروم . برد وعادل بالأمونيا مع وجود دليل أحمر فينول . حمض باستخدام الهيدروكلوريك ٥٪ ، ثم أضف زيادة (٠,٢ مل) من الهيدروكلوريك ١ : ١ ، خفف المحلول إلى حجم معلوم.

لفصل النيكل والكوبالت اسحب ٢٠ مل إلى قمع فصل ١٢٥ مل وأضف ٥ مل محلول سيترات أمونيوم + ٢ مل محلول دي ميثيل جليوكسيم + ١٠ مل محلول الفا ـ نيتروزو ـ بيتا ـ نافثول ورج دقيقتين. اهمل طبقة المذيب واستخلص الطبقة المائية بمقدار ١٠ مل كلوروفورم لإزالة باقي الفا ـ نيتروزو ـ بيتا ـ نافثول . أهمل طبقة المذيب .

ولفصل الزنك وتقديره أضف إلى الطبقة المائية (المزال منها النيكل والكوبالت) ٢٠ مل محلول دي ثيزون + ١٠ مل رابع كلوريد كربون ورج دقيقتين ، واترك لفصل الطبقات ، واسحب الطبقة المائية بماصة . اغسل جدران القمع بحوالي ٢٥ مل ماء ثم اسحب الطبقة المائية ثانية بدون رج . أضف ٢٥ مل يد كل ٠,٠٤ عياري لطبقة المذيب

في القمع ، ورج دقيقة لنقل الزنك للطبقة المائية الحامضية ، واهمل طبقة المذيب . بحرص أزل النقطة المعتمة على سطح المحلول الحامضي المحتوى على الزنك ، وأضف ٥ مل محلول سيترات أمونيوم + ١٠ مل رابع كلوريد الكربون (PH ٨,٨ – ٩,٠) ، ثم أضف ١,٥ مرة قدر الدي ثيزون المتطلب لاستخلاص ٢٠ ميكروجرام زنك . رج دقيقتين واترك لفصل الطبقات، واسحب طبقة رابع كلوريد الكربون ، وخفف منها ٥ مل بمقدار ١٠ مل رابع كلوريد الكربون ، وقس اللون على ٥٤٠ نانومتر . أجر نفس الخطوات على محلول قياسي وعلى عينة خاوية .

ويحتوي الماء السطحي للمحيطات على ٠,٤–٣,٠ جزء / بليون زنك ، ويزيد التركيز إلى ٠,٦ – ١٢,٦ جزء / بليون في المياه قرب الشواطئ ، بينما ماء الشرب قد يحتوي ٠,٢ – ٥,٠ جزء / بليون .

جـ ـ النحاس والزنك Copper and Zinc :

عبارة عن مغذيات دقيقة ضرورية لنمو البلانكتون النباتي لكن بتركيزات بسيطة جدا . والأهم هو سمية هذه المعادن حتى بتركيزاتها المنخفضة (ميكروجرام / لتر) ، خاصة لبيض ويرقات السمك والأصداف . وعادة لا تحدث مشاكل في المياه الطبيعية ، لكن المشاكل في مياه الأحواض وإعادة تداولها Recirculating التي يمكن أن تتلوث بالنحاس والزنك من مواسير المياه أو التانكات المجلفنة Galvanized Tanks . وتعتمد سمية المعدنين للسمك على عسر الماء (مستوى الكالسيوم والماغنسيوم) ووجود المادة العضوية و PH ودرجة الحرارة ، فتكون أكثر سمية بانخفاض العسر والمادة العضوية و PH وبارتفاع درجة الحرارة .

وأساس التقدير هو تكوين معقدات زرقاء اللون من الزنك والنحاس مع الزينكون -2)-1 Hydroxy -5- Sulphophenyl) -3- Phenyl -5- (2 Carboxy-Phenyl) Formazan (Zincon) في وسط قلوي وتميز بثباتها لمحلول EDTA وتقاس ضوئيا .

الكيماويات :

١ ـ محلول الزينكون : أضف ٠,١ جم زينكون إلى ١٠ مل صودا كاوية ١ مولر في دورق معياري ١٠٠ مل ، وأضف ميثانول ورج للذوبان ، وأكمل بالميثانول إلى العلامة .

٢ ـ محلول منظم : أضف ٣,١ جم حمض بوريك H_3BO_3 مع ٣,٧ جم كلوريد بوتاسيوم مع ٢١,٤ مل صودا كاوية ١ مولر وأكمل إلى لتر بالماء المقطر .

٣ ـ محلول EDTA : أذب ٣,٧٢جم Na_2 EDTA في ماء مقطر وأكمل إلى ١٠٠مل.

٤ ـ محلول زنك قياسي : أذب ١,٠٠ جم حبيبات زنك في حوالي ١٠ مل حمض هيدروكلوريك ٤ مولر ، وأكمل إلى لتر بالماء المقطر ، فيحتوي هذا المحلول على ١٠٠٠

مجم / لتر زنك .

٥ ـ محلول نحاس قياسي : أذب ٠,٣١٢ جم بلورات كبريتات نحاس $Cu\ SO_4 . 5H_2O$ نقية في ماء ، وأضف ١٠ مل حمض كبريتيك ٣,٦ مولر ، وأكمل إلى لتر بالماء المقطر فيحتوي هذا المحلول على ١٠٠ مجم / لتر .

التقدير :

٤٠ مل عينة (تحتوي أقل من ٢٠ ميكروجرام من كل معدن) في دورق معياري ٥٠ مل + ٢ مل محلول منظم واخلط جيداً . أضف ٠,٥ مل محلول زينكون ، واخلط وأكمل إلى ٥٠ مل بالماء المقطر ، رج جيدا وبعد ٥ دقائق اقرأ امتصاص الضوء على ٦١٠ نانومتر ضد عينة خاوية (ماء) معدة بنفس الطريقة . أضف ٠,٥ مل محلول EDTA إلى المحلول المتبقي في الدورق واخلط وأعد قراءة الامتصاص الضوئي ضد العينة الخاوية بعد دقيقتين . فالقراءة الثانية ترجع للنحاس بمفرده ، وعليه فالامتصاص الضوئي الخاص بالزنك يحصل عليه بطرح القراءة الثانية من الأولى . تعد منحنيات قياس لمحاليل من كل من النحاس والزنك القياسيين .

د ـ الحديد Iron :

يقدر الحديد بتحويله إلى حديديك باستخدام مادة مؤكسدة مثل بوتاسيوم بيرسلفات ، أو فوق أوكسيد الهيدروجين ، ثم يعامل بثيوسيانات البوتاسيوم لتكوين مركب ثيوسيانات الحديديك ذي اللون الأحمر فيقدر اللون ضوئيا .

الكيماويات :

١ ـ حمض كبريتيك مركز خالي الحديد .

٢ ـ محلول مشبع من بوتاسيوم بيرسلفات $K_2\ S_2\ O_8$: برج ٧-٨ جم من هذا المركب خالي الحديد مع ١٠٠ مل ماء في إناء زجاج بغطاء ، رج قليلا قبل الاستخدام ، واحفظه في ثلاجة .

٣ ـ محلول ثيوسيانات بوتاسيوم ٣ عياري KSCN : أذب ١٤٦ جم في ماء وخفف إلى ٥٠٠ مل مع إضافة ٢٠ مل أسيتون للحفظ .

٤ ـ محلول حديد قياسي : أذب ٠,٧٠٢ جم كبريتات أمونيوم حديدوز $Fe\ So_4 . (NH_4)_2\ SO_4 . 6H_2O$ في ١٠٠ مل ماء ، أضف ٥ مل حمض كبريتيك مركزا ، وسخن ببطء وأضف برمنجنات بوتاسيوم مركزة نقطة نقطة حتى النقطة التي تحدث لونا ثابتا ، هذا المحلول يحتوي المليلتر منه على ٠,١ مجم حديديك والمحلول ثابت .

التقدير :

استخدم ٣ مخابير مدرجة ذى سدادات الأول للعينة الخاوية والثاني للمحلول القياسي

والثالث للعينة كالآتي :

	بلانك	قياسي	عينة
محلول قياسي	—	١ مل	—
العينة	—	—	٥ مل
ماء	٥ مل	٤ مل	—
حمض كبريتيك مركز	٠,٥ مل	٠,٥ مل	٠,٥ مل
بوتاسيوم بيرسلفات	١ مل	١ مل	١ مل
ثيوسيانات بوتاسيوم	٢ مل	٢ مل	٢ مل

أكمل الحجوم إلى ١٥ مل بالماء ، وقدر اللون على ٤٨٠ نانومتر ، واحسب تركيز الحديد مجم حديد / لتر = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٠,١ \times ١٠٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times ٥}$.

والحديد أحد العناصر المغذية الدقيقة الهامة للبلانكتون النباتي ، ويوجد في المياه الطبيعية على حالتين المؤكسدة (حديديك) والمختزلة (حديدوز) . والصورة المختزلة أكثر انتشارا في المياه الفقيرة في الأوكسجين . المياه الأرضية غالبا مشبعة بحديدوز ذائب (غير سام) يتجه للتفاعل مع الهواء لتكوين أوكسيد حديديك مائي يغطس بيض ويرقات السمك النامية .

ويقدر الحديد الكلي باختزال حديد العينة إلى حديدوز بالغليان مع حامض وهيدروكسيل أمين والمعاملة بالفينانثرولين في وسط حامضي (PH ٢,٣-٣,٣) . فإن ٣ جزئيات من الفينانثرولين تحدث چيل Chelate لذره حديدوز لتكوين معقد أحمر ـ برتقالي يقاس ضوئيًا .

الكيماويات :

١ ـ حمض هيدروكلوريك مركز يحتوي على أقل من ٠,٥ جزء في المليون حديد .

٢ ـ محلول هيدروكسيل أمين : أذب ١٠ جم $NH_2OH.HCl$ في ١٠٠ مل ماء مقطرا.

٣ ـ محلول منظم : أذب ٢٥٠ جم خلات أمونيوم $NH_4C_2H_3O_2$ في ١٥٠ مل ماء مقطرا ، وأضف ٧٠٠ مل حمض خليك ثلجيا مركزاً .

٤ ـ محلول فينانثرولين : أذب ١٠٠ مجم $C_{12}H_8N_2.H_2O$ في ١٠٠ مل ماء مقطراً (يحتوي نقطتين من حمض الهيدروكلوريك المركز) بالتقليب والتسخين دون الغليان .

٥ ـ محلول حديد قياسي : أضف ببطء ٢٠ مل حمض كبريتيك مركزا لمقدار ٥٠ مل ماء مقطرا ، ثم أذب ١,٤٠٤ جم كبريتات أمونيوم حديدوز $Fe (NH_4)_2 (SO_4)_2 . 6H_2O$. أضف محلول برمنجنات بوتاسيوم $KMnO_4$ يحتوي ٣,٢ جم / لتر بواسطة التنقيط حتى يوجد لون خافت ، خفف إلى لتر بماء مقطر خالي الحديد واخلط ، المحلول يحتوي ٢٠٠ مجم / لتر .

التقدير :

انقل ٥٠ مل عينة إلى دورق مخروطي ١٢٥ مل . أجر عينة خاوية ومحاليل قياسية بنفس الطريقة . أضف ٢ مل حمض هيدروكلوريك مركزا + ١ مل محلول هيدروكسيل أمين . أضف بضع كرات مانعة للفرقعة ، وسخن للغليان واستمر حتى ينخفض حجم العينة إلى ٢٥-٢٠ مل ، برد إلى حرارة الغرفة ، ثم انقل إلى دورق معياري ٥٠ مل . أضف ١٠ مل محلولا منظما + ٢ مل محلول فينانثرولين وخفف إلى العلامة بماء مقطر . اخلط واتركها بعيدا عن ضوء الشمس لمدة ١٥ دقيقة ثم قس امتصاص الضوء ضد عينة خاوية (لنفس المحاليل المستخدمة) على ٥٠٨ نانومتر .

هـ ـ الكروم في الماء Chromium :

يوجد الكروم في ماء البحر بتركيز ١ جزء / بليون ، وفي الأنهار ١-١٠ جزء / بليون ، وفي مياه المجاري بتركيز حتى ٣٥ جزء / بليون .

ولتقدير كروم الماء يجرى فصله بالتبادل الأيوني ، أو يستخلص إلى طبقة عضوية كما في ثلاثي أوكتيل ميثيل أمونيوم كلوريد في كلوروفورم ، أو بمثيل أيزوبيوتيل كيتون ، أو يفصل باستخدام كبفرون ثم يستخلص معقد الكبفرون ـ كروم بالكلوروفورم . أما تقدير الكروم فيتم بوضع ٢ مل محلول دي فينيل كاربازيد (٠,٢٥٪ ، ٥٠ مجم في ٢٥ مل أسيتون تحضر يوميا طازجا) في دورق معياري مع ١٠ مل حمض كبريتيك ١ عياري مع ٢-١٠ مل عينة ، خفف إلى العلامة ١٠٠ مل ، وانتظر ٥ دقائق ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٥٤٠ نانومتر ضد بلانك من الماء، وأجر تقدير مماثل على محلول قياسي (٢,٨٢ جم ثاني كرومات بوتاسيوم في لتر ماء تعطي محلولا تركيزه ١ جم / لتر) .

و ـ الرصاص Lead :

يوجد الرصاص في الأسماك عادة بتركيز حوالي ٠,٠١ جزء في المليون ، وفي المحار بتركيز ١,٠ جزء في المليون ، وفي الماء تحت ٠,٠٢ جزء في المليون .

ويستخلص الرصاص في وسط قلوي ديثيزون مكونا معقداً من رصاص ـ ديثيزون لونه أحمر فيقاس كثافته الضوئية على ٥١٠ نانومتر .

التقدير :

يؤخذ حجم معلوم من العينة ، وتعادل بالأمونيا المركزة إذا لزم الأمر مع إضافة ٠,٥ مل زيادة ، وبدون تأخير يضاف ١ مل سيانيد بوتاسيوم (١٠ ٪) ، وتنقل إلى قمع فصل ٢٥٠ مل وتستخلص لمدة دقيقة ٣ مرات كل منها بمقدار ١٠ ثم ٥ ثم ٥ مل محلول ديثيزون (٠,١ ٪ في كلوروفورم) وتكرر الاستخلاص حتى يصير لون الديثيزون أخضر ، فتجمع طبقات المستخلص الكلوروفورمي في أنبوبة وتبخر حتى الجفاف ، فيضاف إليها ٠,٧ مل حمض كبريتيك مركز ، ونقط من حمض النيتريك المركز ، وسخن حتى تمام هدم المادة العضوية . برد وخفف بمقدار ٥ مل ماء مقطراً ، وسخن حتى يبدأ الحامض في التدخين . برد وبحرص أضف ١٥ مل إيثانول ٣٢ ٪ ورج واتركه ليلة . رشح على ورق واتمان رقم ٤٤ مبلل بحمض هيدروكلوريك ٢٠ ٪ . اغسل ٣ مرات بمخلوط (٢٠ مل ماء + ١٠ مل إيثانول + ١ مل حمض كبريتيك مركزاً) . أضف ١٠ مل خلات أمونيوم ١٠ ٪ ، واغل ورشح واغسل بمقدار ٥ مل خلات أمونيوم مخففاً ساخناً . أضف ٣٠مل من مخلوط (٣٤٠ مل هيدروكسيد أمونيا كثافة ٠,٠٨٨ + ٧٥ مل سلفيت صوديوم ٢٠ ٪ + ٣٠ مل سيانيدبوتاسيوم ١٠ ٪ + ٦٠٥ مل ماء مقطرا) مع ١٠ مل كلوروفورم + ٥, مل ديثيزون . رج بشدة لمدة دقيقة واتركه لفصل الطبقات .استبعد قليلا من طبقة الكلوروفورم ، ثم رشح على قطن / صوف زجاجي ، واستبعد أول قطرة من الراشح واستقبل الراشح في خلية سبكتروفوتومتر ، وقدر الكثافة الضوئية على طول موجة ٥١٠ نانومتر للعينات والمحلول القياسي ضد عينة خاوية من الكلوروفورم . المحلول القياسي يحضر بإذابة ١,٦٠جم نيترات رصاص $Pb(NO_3)_2$ في ماء مع ١٠ مل حمض نيتريك مركز وخفف إلى لتر ثم يخفف منه ١مل إلى ١٠٠مل بالماء (١ مل = ١٠ ميكروجرام رصاص) .

وباختصار يؤخذ ٣٠٠سم³ من عينة الماء ويضاف إليها ١,٥سم³ من حمض هيدروكلوريك (٢٤ ٪)، ثم يغلي لمدة ٤ دقائق ، برد وعادل بنقط من الأمونيا حتى PH ٢ ، انقل إلى قمع فصل مع ١٠٠سم³ من محلول (١٠سم³ هيدرازينيوم (١٠ جم كلوريد صوديوم + ٥سم³ هيدروكسيد هيدرازينيوم ٢٤ ٪ + ٣٥سم³ حمض هيدروكلوريك ١ مول/ لتر وأكمل بالماء حتى ٥٠سم³) + ١٠سم³ سيانيد وطرطرات (٤٠ جم بيكربونات بوتاسيوم + ١٠ جم سيانيد بوتاسيوم + ١٠ جم طرطرات صوديوم وبوتاسيوم + ٤٠سم³ نشادر ٢٥ ٪ ويكمل إلى ٠٠سم³) + ٥٠سم³ دي ثيزون (٣٠ مجم / لتر كلوروفورم) . رج عدة مرات لمدة ١٠ دقائق واترك لفصل الطبقات ، تقاس شدة الامتصاص لطبقة الكلوروفورم على ٥١٠ نانومتر ضد ماء .

والرصاص معدن سام جدا للأسماك واللافقاريات ، ويوجد في ماء البحر (٠,٠٨ – ١,

ميكروجرام/ لتر) والماء الأرضي (١,٥-٦٠ ميكروجرام/لتر) والماء السطحي (صفر-٥٥ ميكروجرام / لتر) . ويمكن تقدير الرصاص / كذلك بمطياف الضوء ذي اللهب لقياس الامتصاص الذري .

ويمكن حفظ العينات لعدة أشهر على حرارة الغرفة بإضافة ٢سم^{٣} حمض نيتريك / لتر ماء للوصول إلى PH أقل من ٢ .

ز ـ الكادميوم Cadmium :

يحتوي الماء السطحي في المحيطات على الكادميوم بتركيز ٠,٠١ - ٠,١٨ جزء / بليون، بينما يزيد في الماء الشاطئي إلى ٠,٠٢-٠,٣٠ جزء/ بليون .

وللتقدير يؤخذ ٢٠ مل ماء ، وتعادل حموضتها بالصودا الكاوية في وجود دليل أزرق الثيمول ، ويضبط الحجم إلى ٢٥ مل . أضف ١ مل محلول طرطرات صوديوم بوتاسيوم (٢٥ جم / ١٠٠ مل ماء) واخلط ، ثم ٥ مل محلول سيانيد بوتاسيوم ـ هيدروكسيد صوديوم (٤٠ جم صودا كاوية + ١ جم سيانيد بوتاسيوم / ١٠٠ مل ماء) واخلط ، ثم ١ مل محلول هيدروكسيل أمونيوم كلوريد (٢٠ ٪) ، ثم ١٥ مل ديثيزون (٨٠ مجم / لتر كلوروفورم وتحفظ في ثلاجة ويستخدم بارداً) . رج لمدة دقيقة ، اسحب الطبقة السفلى (كلوروفورم) إلى قمع فصل آخر يحتوي ٢٥ مل محلول حمض طرطريك (٢ ٪ ويحفظ في ثلاجة ويستخدم باردا) . استخلص ثانية بكلوروفورم (١٠ مل) ، وأضف الطبقة السفلى إلى قمع الفصل الثاني المحتوي على حمض الطرطريك . رج دقيقتين ، واسمح بفصل الطبقات ، وأهمل الطبقة السفلى . أضف ٥ مل كلوروفورم ، ورج ثانية لمدة دقيقة، واهمل مرة أخرى الطبقة السفلي . كل الكادميوم الآن انتقل إلى محلول حمض الطرطريك . أضف ٠,٠٢٥ مل هيدروكسيل أمونيوم كلوريد + ١٥ مل محلول قياسي ديثيزون (٨ مجم / لتر كلوروفورم وتحفظ في ثلاجة ، وتدفأ على حرارة الغرفة قبل الاستخدام) + ٥ مل محلول صوديوم هيدروكسيد ـ سيانيد بوتاسيوم (٤٠ جم صودا كاوية + ٠,٠٥ جم سيانيد بوتاسيوم في ١٠٠ مل ماء) ، ورج دقيقة للتخلص من المعادن الأخرى . رشح طبقة الكلوروفورم على قمع به سدادة من القطن والصوف . قدر الكثافة الضوئية للعينة وللبلانك (من محاليل التقدير المختلفة) والمحلول القياسي (١٠ مجم / لتر بإذابة ٠,١ جم معدن كادميوم في ٥٠ مل حمض نيتريك ١٠ ٪ ، ويغلي ثم يخفف إلى لتر ، ثم يخفف منه ١٠ مل إلى ١٠٠ مل بحمض النيتريك ١ ٪) الذي أجريت عليها نفس الخطوات المتبعة في التقدير للعينة وذلك على طول موجة ٥١٨ نانومتر .

ح ـ الزئبق Mercury :

تحتوي لحوم الأسماك على الزئبق أساسا في صورة مركبات ميثيل زئبق ، وذلك من

تلوث الماء ومواد العلف بالزئبق . ويفصل الزئبق بالداي ثيزون في وسط حامضي PH أقل من ١ . فتؤخذ عينة من الماء (٢٠٠سم٣) وتحمض بحمض كبريتيك ٠,٥ عياري حتى تصل PH لأقل من ١ ، ثم تستخلص العينة بالداي ثيزون (٠,٥ جم / لتر رابع كلوريد كربون ، ويغسل هذا المحلول في قمع فصل بالنشادر تركيز ٠,٥ ٪ عدة مرات حتى يصير لونه أخضر، ثم يغسل بالماء وقبل الاستعمال مباشرة يخفف بنسبة ١ : ٢٠ برابع كلوريد الكربون) عدة مرات في كل مرة بحجم ٢٠سم٣ حتى يصير لون المستخلص في آخر مرة أخضر . تفصل الطبقة العضوية وتغسل ٤ مرات بمحلول الأمونيا ٠,٥ ٪ بمقدار ٣٠سم٣ في كل مرة ثم يضاف إليها ٢٥سم٣ من حمض الخليك ١٥ ٪ . تقاس شدة الامتصاص في الطبقة العضوية على طول موجة ٤٨٥ نانومتر ضد مقارنة من الماء . يعمل منحنى قياسي من الزئبق تركيز ٥٠-٥٠٠ ميكروجرام / لتر (المحلول القياسي يمكن تحضيره من إذابة ٠,٣٣٨ جم كلوريد زئبقيك في ٥٠٠سم٣ من حمض كبريتيك ٠,٥ عياري للحصول على محلول تركيز الزئبق فيه ٥٠٠ ميكروجرام / لتر) .

ط ـ النيكل Nickel :

رغم أن النيكل في الماء منخفض التركيز (٠,١٢-٦٠ جزء / بليون في ماء البحار) ، إلا أنه يزيد في مياه صرف المناجم . ونظراً لانخفاض تركيزه في المياه عن حدود اكتشافه بالطرق الضوئية ، فيجرى تركيزه واستخلاصه من لتر ماء على عمود ١٠ × ١سم من راتنج مثل دويكس Dowex A1 ذي أقطار جزيئات ٣٠ - ٧٠مش Mesh في صورة صوديوم على PH ٦,٥ فيؤكسد أولا الحديدوز بإضافة فوق أوكسيد الهيدروجين ٣٠٪ للعينة المحمضة ، والزيادة من فوق أوكسيد الهيدروجين تزال بالغليان . يضبط PH على ٦,٥ بواسطة خلات صوديوم تركيز ٢ مول / لتر ، ثم تنقل العينة بعد ذلك للعمود بمعدل تدفق ٣,٥ مل / دقيقة ، ويغسل العمود ٣ مرات × ١٠ مل ماء مقطرا ، يسحب النيكل (والعناصر النادرة الأخرى) بغسيل العمود بحمض هيدروكلوريك (٥٠ مل) تركيز ٢ مول / لتر (معدل تدفق ٠,٥-١ مل / دقيقة) . بخر الغسول الأخير في طبق سليكا . أذب المتبقيات بواسطة ٢ مل حمض هيدروكلوريك ١٢ مول / لتر ، وانقل إلى عمود شديد القلوية كمبادل أنيوني (Dowex 1-X8 قطر جزيئاته ٥٠-١٠٠ مش في صورة كلوريد) ١١ × ٠,٧سم سبق معاملته بحمض هيدروكلوريك ١٢ مول / لتر . يتم الحصول منه على النيكل بغسيله بحمض هيدروكلوريك (٣٠ مل) ١٢ مول / لتر . بخر في طبق سليكا وأعد الإذابة في ١٠ مل ماء مقطرا ، وانقل إلى دورق معياري ١٠ مل .

وللتقدير يضاف ٥ مل محلول PAR (٥٠ مجم ٤ ـ ٢ ـ بيريد يلازو ـ ريسوسينول أحادي الصوديوم أحادي الماء نقية تذاب في ماء يحتوي نقط هيدروكسيد صوديوم ١٢

مول / لتر ويخفف إلى ١٠٠ مل). اتـرك ١٠ دقائق ، ثم أضف ٥ مل محلـول سـترات بوتاسـيوم (٩٦,٠٦ جم حمض سيتريك في ٢٠٠ مل ماء ثم يضاف إليهـا ٨٤ جم هيدروكسيد بوتاسيوم بالتقليب والتبريد وتضبط PH على ٩,٦ وخفف بالماء إلى ٢٥٠ مل) + ٥ مل محلول منظم بورات (٦١ جم حمض بوريك في ماء ويضبط PH على ٩,٦ بالبوتاسا الكاوية ١٥٪ ويخفف إلى لتر بالماء) + ٢٠ مل محلول EDTA (٤٦,٦ جم إيثيلين دي أمين تترا أسيتيك ثنائي الصوديوم ثنائي الماء في ٤٠٠ مل ماء ويضبط PH على ٩ بالصـودا الكاوية ويكمل بالماء إلى ٥٠٠ مل) . خـفف إلى ٥٠ مل بالماء ، ثم اقـرأ الكثافة الضوئية على ٥٠٠ نانومتر ضد الماء والمحلول القياسي (أذب ٠,٢٥ جم نترات نيكل نقية سداسية الماء في لتر ماء ويخفف منه ١٠ مل إلى ١٠٠ مل ليحتوي تركيز ٥ ميكروجرام / مل) .

ى ـ الكوبلت Cobalt :

يحتوي الماء السطحي كميات بسيطة من الكوبلت (أقل من ٢ جزء / بليون) لكن يزيد التركيز في المياه المعدنية (٠,٠٢ - ١٢ جزء / بليون) .

ولتقدير الكوبلت يؤخذ ناتج تركيز الماء بعد غسيل عمود المبادل الأيوني (كما في النيكل) في دورق معياري سعة ٢٥ مل ، ويضاف إليها ٢,٥ مل ثيويوريا (٧,٦١ جم في لتر ماء) + ١,٥ مل سترات صوديوم (٩٦,٠٦ جم حمض سيتريك في ماء ويضبط PH على ٨,٢ باستخدام الصودا الكاوية ويخفف إلى ٥٠٠ مل) + ٥ مل بورات (١٥,٤٦ جم حمض بوريك تذاب في صودا كاوية نقية ٣٠٪ لتعطي PH ٨,٩ وتخفف بالماء إلى ٥٠٠ مل) + ٢ مل دليل PAR (أذب ٠,٢٧ جم ٤-٢- بيريديلازو - رسورسينول أحادي الصوديوم أحادي الماء في قليل من الصودا الكاوية المخففة وأكمل إلى ١٠٠ مل بالماء). اخلـط واختبر PH لتكـون بين ٨ و٩ . اتـرك ٥ دقـائـق ثم أضف ٢,٥ مـل EDTA (٣٧,٢٢ جم في لتر ماء) وخفف إلى ٢٥ مل بالماء . وحضن في حمـام مائي على ٨٠°م ١٠ دقائق . برد واقرأ الكثافة الضوئية على ٥١٠ نانومتر ضد ماء ، مع تقدير الكثافة الضوئية للمحلول القياسي (٠,١ جم معدن كوبلت تسخن مع مخلوط أحماض نيتريك وهيدروكلوريك مركزة ، وتبخرالزيادة من الهيدروكلوريك ، وتخفف المتبقيات بالماء إلى لتر ليصير تركيز الكوبلت ١٠٠ مجم / لتر) .

ك ـ المولبيدنم Molybdenum :

المولبيدنم كغيره مـن المعادن الثقيلة لا يوجـد في المياه الطبيعية إلا بتركيزات أثرية ، ففي ماء البحر تركيزه ٠,٥ - ٢ جزء / بليون ، وهو في الماء السطحي يتباين ما بين ٠,١ إلى ٦٠ جزء / بليون ، لكنه في نواتج صرف مصانع النحاس مثلا يوجد بتركيز ٤٧ جزء /

بليون .

وللتقدير ينقل ٥ مل عينة إلى قمع فصل ويضاف إليها ٢ مل حمض هيدروكلوريك مركزا + ١ مل محلول كبريتات حديدوز ١ ٪ (٢ جم كبريتات حديدوز أمونيوم تذاب في ٢٠٠ مل ماء ويضاف إليها ١ مل حمض كبريتيك مركز + ٣ مل محلول ثيوسيانات بوتاسيوم ١٠ ٪ (أذب ٥٠ جم في ماء وأكمل إلى ٥٠٠ مل) + ٣ مل محلول كلوريد قصديروز (أذب ٣٥٠ جم في ٢٠٠ مل حمض هيدروكلوريك (١+١) ساخن واترك ١٢ ساعة ثم رشح وخفف إلى لتر بالماء . المحلول لا يستعمل بعد أسبوع من تحضيره) + ٢٥ مل ماء + ١٠ مل خلات بيوتيل . رج المخلوط لدقيقتين واترك لفصل الطبقات . انقل الطبقة المائية إلى قمع فصل آخر ، ورج دقيقتين مع ٥ مل خلات بيوتيل أخرى . أضف إلى الطبقات العضوية ٢٥ مل محلول غسيل (١٠٠ مل حمض كبريتيك مركزا تضاف إلى ٧٠٠ مل ماء ، وتبرد ثم يضاف ١٠ مل محلول كلوريد قصديروز + ١٠ مل محلول بوتاسيوم ثيوسيانات وأكمل بالماء إلى لتر) ورج دقيقة . اهمل الطبقة المائية ، وانقل الطبقة العضوية إلى دورق معياري ٢٥ مل يحتوي ٠,٥ جم كبريتات صوديوم لامائية ، وأكمل بخلات البيوتيل إلى العلامة . اقرأ الكثافة الضوئية على ٤٧٥ نانومتر خلال ١٥ دقيقة من إضافة الثيوسيانات . يلاحظ تبريد الدلائل على ١٥°م قبل الاستخدام إذ أن الحرارة الأعلى تؤثر على الكثافة اللونية . يجرى التقدير على محلول قياسي (أذب ١,٥ جم ثلاثي أوكسيد الموليبدنم في ٢٥ مل صودا كاوية ٢ مول / لتر ، حمض بقليل من حمض الهيدروكلوريك وخفف إلى لتر بالماء ، ثم خفف منه ١٠ مل إلى لتر بالماء فيكون تركيز الموليبدنم ١٠ مجم / لتر) .

ل ـ السلنيوم Selenium :

يوجد السلنيوم في المياه الصالحة للشرب بتركيز أقل من ١٠ جزء / بليون ، وفي مياه النز من تربة غنية بالحديد والسلنيوم بتركيز حتى ٥٠٠ جزء / بليون ، وفي مياه الأنهار بتركيزات ١٠ – ٣٥٠ جزء / بليون ، وعند مصبات الأنهار حتى ٤٠٠ جزء / بليون ، بينما في ماء البحار حتى ٥٠ جزء / بليون .

ولتقدير السلنيوم في الماء يؤخذ لتر ماء في كأس سعة ٢ لتر ، ويضاف إليه ١٠ نقط دليل برتقالي ميثيل (٥٠٠ مجم في لتر ماء) ، وعاير بحمض هيدروكلوريك ٠,١ مول / لتر مع إضافة ٢ مل زيادة . أضف ٣ نقط محلول برمنجنات بوتاسيوم ٠,٠٢ مول / لتر (٣,٢ جم / لتر ماء) + ٥ مل محلول كالسيوم كلوريد (٣٠ جم ثنائي الماء / لتر) وسخن حتى الغليان ، وأضف مزيدا من البرمنجنات لحفظ دوام اللون الأرجواني . ركز حتى حجم ٢٥٠ مل ، وانقل كميا إلى دورق مخروطي سعة ٥٠٠ مل. أضف ٥ مل صودا

كاوية ١,٠ مول / لتر وبخر حتى الجفاف . برد وأضف ٥ مل حمض هيدروكلوريك مركزا + ١٠ مل محلول كلوريد أمونيوم واغل على حمام مائي ١٠ دقائق . انقل كميا إلى كأس سعة ١٠٠ مل بواسطة ٥ مل دليل كبريتات EDTA (١٠٠ جم ملح ثنائي صوديوم EDTA ثنائي الماء + ٢٠٠ جم كبريتات صوديوم في لتر ماء ، وأضف بالتنقيط أمونيا مركزة لتمام الذوبان) + ٥ مل أمونيا ٥ مول / لتر (أمونيا ١ :٢) ، واضبط PH إلى ١,٥ بمحلول الأمونيا . أضف ١ مل دليل ثنائي أمينوبنزيدين (١٠٠ مجم ٣-٣- دي أمينوبنزيدين هيدروكلوريد في ١٠ مل ماء تحضر طازجاً ليس أطول من ٨ ساعات) بواسطة ماصة أوتوماتك ، وسخن في حمام ماء يغلي ٥ دقائق . برد وأضف أمونيا مركزة واضبط PH إلى ٨ وأذب أي رواسب تتواجد .

حضر محلول قياسي (١ جم سلنيوم في كأس مع ٥ مل حمض نيتريك مركزا ، وسخن لتمام التفاعل حتى الجفاف وانقل كميا في دورق معياري سعة لتر وخفف إلى العلامة بالماء ، ثم خفف ١ مل إلى لتر بالماء (طازج يوميا) فيحتوي المحلول الأخير ١ مجم / لتر) وخذ منه حجما معلوما وخففه إلى ٢٥٠ مل بالماء ، وأضف ١٠ نقط دليل برتقالي ميثيل + ٢ مل حمض هيدروكلوريك ١,٠ مول / لتر + ٥ مل محلول كلوريد كالسيوم + ٣ نقط محلول برمنجنات بوتاسيوم ٠,٠٢ مول / لتر واغل ٥ دقائق .

انقل كل من العينة والمحلول القياسي إلى مخابير مدرجة سعة ٥٠ مل ، واضبط الحجم إلى ٥٠ مل ، ثم انقل محتويات كل مخبار إلى قمع فصل مع ١٠ مل تولوين ورج ٣٠ ثانية ، وافصل الطبقات ، واهمل الطبقة المائية ، وانقل الطبقة العضوية إلى أنبوبة طرد مركزى ، واطرد مركزيا لترويق المستخلص التولويني من قطرات الماء (أو رشح على كبريتات صوديوم لامائية ١,٠ جم) وقدر الكثافة الضوئية على ٤٢٠ نانومتر .

١٦ - الكبريتيد Sulphide والكبريتات Sulphate :

يوجد الكبريتيد في الماء فقير الأوكسجين Anoxic Water ، أي منخفضة المحتوى من الأوكسجين الذائب ، وذلك في ثلاثة صور : إما غير متأين H_2S ، أو أيونات HS ، أو أيونات S^{2-} . وهو سام جدا للأسماك وربما مصدره طين الحوض فقير الأوكسجين ، خاصة في التربة المحتوية على الكبريتات الحامضية ومستنقعات صرف الماء . وتقدر الكبريتيد بتفاعلها مع مركب بارافينيلين دي أمين P-Phenylene diamine في وجود أيون الحديديك فتنتج صبغة زرقاء تقاس بأجهزة قياس الألوان الكهربية .

ونظراً لأن كبريتيد الهيدروچين سريع التأكسد بالهواء أو الأوكسچين الذائب ، كما أنه سريع التطاير ؛ لذا يجب الحذر عند جمع العينة وفي تقديره ، بحيث يطرد الهواء . فتجمع العينات في أواني تملأ كاملا بحجم ١٠٠-١٢٥ مل ولها سدادات زجاج مع سرعة

تقديره بدون تأخير . ويمكن للحفظ أن يرسب الكبريتيد بإضافة ٢ مل محلول ١ مولر من خلات الزنك (٢٤٠ جم / لتر $Zn(CH_3COO)_2 . 2H_2O$) لكل لتر عينة. وتفصل جزيئات الكبريتيد عن الكبريتيد الذائب بالطرد المركزي ثم يحلل كل من الرائق والراسب .

الكيماويات :

أ ـ ن ـ ن ـ دى إيثيل ـ بارا ـ فينيلين دي أمين كبريتات N,N-Diethyl -P- Phenylene Li-amine Sulphate : يذاب ٢ جم من هذا الملح في ١٠٠ مل حمض كبريتيك تركيز ٥٠٪ حجم / حجم ، ويمكن حفظ هذا الدليل في الظلام لمدة شهر .

ب ـ كبريتات حديديك أمونيوم Ammonium Ferric Sulphate : يذاب ١٨ جم $NH_4Fe(SO_4)_2 . 12H_2O$ في ماء ويكمل حتى ١٠٠ مل .

جـ ـ محلول يود قياسي تركيز ٠,٠٢٥ مولر ، بتخفيف ٥٠ مل من محلول يود ٠,١٠٠ مولر بالماء إلى ٢٠٠ مل .

د ـ محلول ثيوكبريتات صوديوم قياسي تركيز ٠,٠٢٥٠ مولر : بإذابة ٦,٢٠٥ جم $Na_2S_2O_3 . 5H_2O$ في لتر ماء مقطرا . ويعاير بمحلول يودات كما سبق ذكره في تقدير الأوكسچين الذائب . ١ مل من هذا المحلول تكافىء ٠,٤٠ مجم S^{2-} .

هـ ـ محلول النشا يذاب ١ جم نشا ذائب في ١٠٠ مل ماء مقطرا ، ويرشح إذا لزم الأمر.

و ـ حمض هيدروكلوريك ١ مولر .

ل ـ محلول كبريتيد صوديوم قياسي : حوالي ١ جم $Na_2S . 9H_2O$ تضاف إلى حوالي ٨٠٠ مل ماء خالي الأوكسچين ويكمل إلى لتر وهذا المحلول غير ثابت فلا يخزن .

الماء خالي الأوكسچين يحضر بضخ غاز خامل (كالنيتروچين) في ماء مقطر لمدة ساعة على الأقل .

ويعاير محلول كبريتيد الصوديوم باستخدام دورق مخروطي سعة ٢٥٠ مل به حوالي ٨٠ مل ماء مقطرا ثم يضاف إليها ١٠ مل حمض هيدروكلوريك ١ مولر ، ثم ١٠,٠ مل محلول يود تركيز ٠,٠٢٥ مولر ، ويخلط . تملأ سحاحة سعة ١٠ مل بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم تركيز ٠,٠٢٥٠ مولر ، وينقط منها على المخلوط بالدورق المخروطي حتى يصير لونه أصفر باهتا ، فيضاف بضع نقط من دليل النشا ويستمر التنقيط حتى يختفي اللون الأزرق . سجل حجم الثيوكبريتات المستعمل في التنقيط (ح١) . حضر دورقا آخر به الماء المقطر وحمض الهيدروكلوريك ومحلول اليود وبعد الخلط أضف ١٠,٠ مل محلول كبريتيد قياسي (سابق التحضير) . اخلط وسد الدورق واتركه دقيقتين ، ثم نقط باقي اليود بالثيوكبريتات كما سبق وسجل حجم الثيوكبريتات (ح٢) ، واحسب تركيز محلول الكبريتيد القياسي من المعادلة:

مجم S^{2-} لكل مل = $\frac{\text{ح١ - ح٢}}{\text{١٠}} \times ٠,٤٠$

حضر محلولا مخففا للعمل بأخذ ١٠,٠ مل محلول كبريتيد قياسي وتخفيفه في دورق معياري ٥٠٠ مل إلى العلامة بالماء خالي الأوكسجين ، ثم املأ زجاجة عينات بسدادة بهذا المحلول المخفف وشمعها متفاديا حبس أي فقاعات هواء . اطرد مركزيا ١٥ دقيقة على ٢٥٠٠ لفة في الدقيقة ، املأ ثلاث دوارق معيارية سعة كل منها ١٠٠ مل بالماء خالي الأوكسجين إلى العلامة ، ثم اسحب من كل منها ٥,٠ ، ١٠,٠ ، ٢٥,٠ مل بالترتيب وحل محلها بنفس الكميات من المحلول المخفف للكبريتيد وأعد سد الدوارق واخلطها .

التقدير :

اطرد مركزيا العينات في زجاجاتها لمدة ١٥ دقيقة على ٢٥٠٠ لفة / دقيقة . إذا كان تركيز الكبريتيد أقل من ٢٥٠ ميكروجرام / لتر فانقل ١٠٠ مل من العينة المطرودة مركزيا إلى دورق معياري سعة ١٠٠ مل وسده مباشرة ، أما إذا كان التركيز أعلى فيخفف العينة بماء خالي الأوكسجين بنفس طريقة تخفيف المحاليل القياسية أي يملأ الدورق بالماء ثم يسحب منه حجم معين ويستبدل بالعينة (بدل المحلول القياسي) .

يضاف إلى كل دورق من دوارق العينات والمحاليل القياسية ١ مل من دليل كبريتيد الفينيلين دي أمين ويغطى بسرعة ويخلط ، وبعد ٥ دقائق يضاف ١ مل من دليل كبريتات حديديك الأمونيوم ويخلط ، وبعد ١٥ دقيقة يقاس الامتصاص الضوئي على ٦٧٠ نانومتر ، ويعد منحنى قياسي لمحاليل كبريتيد لحساب تركيز العينات منه .

وتتلوث المياه بالكبريتات الناتجة من الصرف الصناعي ، ويتم تقدير الكبريتات بترسيبها في صورة كبريتات باريوم ، فيضاف ١سم^{٣} من حمض هيدروكلوريك إلى ١٠٠سم^{٣} من عينة الماء ، وتسخن حتى الغليان ، يضاف محلول كلوريد باريوم (١٠جم / ٩٠سم^{٣} ماء) نقطة نقطة حتى يتوقف تكوين الراسب ، رشح بعد أن يبرد على ورق ترشيح خالي الرماد ، انقل ورق الترشيح إلى جفنة موزونة ، احرق على ٨٠٠ْم لمدة نصف ساعة ، برد الجفنة وأعد وزنها لحساب وزن كبريتات الباريوم ، احسب تركيز الكبريتات

(مجم / لتر) = $\frac{\text{وزن كبريتات الباريوم جم} \times ٤١١,٥}{\text{حجم العينة}}$.

ثانيا : الهوائم النباتية

ترتبط صبغات التمثيل الضوئي Determination of Photosynthetic Pigments : خاصة كلوروفيل (أ) بمحصول البلانكتون النباتي في الماء ، وعليه فيمكن تقدير الأخير لو قدر الكلوروفيل (أ) ، خاصة وأن تقدير الكلوروفيل أسرع من العد الفردي لخلايا البلانكتون النباتي . فوزن البلانكتون النباتي في وحدة الحجوم أو في عينة ما دليل جيد للإنتاجية الأولية وبالتالي لإنتاج السمك المتحصل عليه في المزارع السمكية والبحيرات الطبيعية .كما أن البلانكتون النباتي كغذاء أساسي للمحار المرشح للغذاء Fitter - Feeding Molluscs وعليه فمعدل نمو هذه المحار يرتبط بمستوى الكلوروفيل في الماء . كما يرتبط تركيز الكلوروفيل بمستوى الفوسفور والنيتروچين والغنى الغذائي للماء ، كما يرتبط عكسيا مع شفافية الماء Water Transparency .

وأهم صبغات البناء الضوئي في النباتات الخضراء بما فيها الطحالب هي / كلوروفيل (أ ، ب ، جـ) إلا أن كلوروفيل (أ) أهمها وظيفيا وكميا إذ يصل تركيزها في البلانكتون النباتي حوالي ٥ أضعاف كلوروفيل (ب) .

ولتقدير الكلوروفيل يؤخذ ٠,٥ لتر من ماء الشواطئ ، أو الماء الغني غذائيا ، أو حتى ٥ لتر من الماء الأقل غذاء البعيد عن الشاطئ ويرشح على شبكة نيلون سعة ثقوبها ٣٠٠ ميكرومتر لإزالة البلانكتون الحيواني الكبير ، ثم تحفظ العينة في أواني بولي ثين في مكان بارد مظلم حتى ٨ ساعات مع ٢ ـ ٣ نقط من معلق كربونات ماغنسيوم ١٠ جم / لتر .

الكيماويات :

أ ـ أسيتون ٩٠٪ : بماصة انقل ١٠٠ مل ماء مقطرا إلى دورق معياري ، وأكمل إلى لتر بأسيتون نقي ، واحفظه في إناء زجاجي معتم .

ب ـ معلق كربونات ماغنسيوم : أضف ١ جم كربونات ماغنسيوم نقية ناعمة إلى ١٠٠ مل ماء مقطرا ورج بشدة قبل الاستخدام .

جـ ـ حمض هيدروكلوريك ١,٢ مولر تقريباً : خفف ١٠ مل حمض مركزاً إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر .

التقدير :

رج إناء العينة جيدا ، ورشح حجماً معلوما من العينة خلال ورق ترشيح غشائي قطره ٤,٥ سم (مثل Millepore HA) ، أو ورق ترشيح ألياف زجاج (Whatman GF/ C) ،

وأضف ١ مل معلق كربونات ماغنسيوم (إذا لم يكن قد أضيف من قبل أثناء تحضير العينة) إلى العينة عند ترشيحها . وإذا استخدم ورق GF/C في الترشيح فيطحن ويغسل بمليمترات قليلة من الأسيتون ٩٠٪ وكذا مطحنة الأنسجة ، وينقل الأسيتون إلى أنبوبة طرد مركزي ١٥ مل . أما إذا استخدم الورق الغشائي فينقل كاملا لأنبوبة الطرد المركزي المحتوية ١٥ مل أسيتون ٩٠٪ فيذوب الغشاء كاملا . ضع أنبوبة الطرد المركزي في ثلاجة مظلمة تماما لمدة ٢٠ ساعة تقريبا لاستخلاص الصبغات . انقلها إلى حرارة الغرفة في الظلام ، وأكمل الحجم للمستخلص إلى ١٠,٠ مل بالأسيتون ٩٠٪ واطرد مركزيا ٥-١٠ دقائق . انقل الطبقة العليا الرائقة إلى خلية سبكتروفوتومتر وقس امتصاص الضوء دون تأخير على ٦٦٥ ، ٧٥٠ نانومتر باستخدام أسيتون ٩٠٪ كعينة خاوية (القراءة الأخيرة للتصحيح للمركبات الملونة الأخرى والعكارة غير العضوية التي قد توجد ، إذ أن الكلوروفيل وصبغات الفيو Phaeo - Pigments لا تمتص تقريبا ضوء على ٧٥٠ نانومتر ، وصبغات الفيو ناتج هضم البلانكتون الحيواني للبلانكتون النباتي ، وتتداخل صبغات الفيو مع تقدير صبغات الكلوروفيل في البلانكتون النباتي الحي ، بينما يهدم الكلوروفيل إلى كلوروفيلليد Chloro-phyllide في البلانكتون النباتي الميت إلا أن هذا الكلوروفيلليد لا يمكن تمييزه من الكلوروفيل النشط بطرق سبكتروفوتومترية ، بينما صبغات الفيو تقدر منفصلة بقياس التغيير الحادث في امتصاص الضوء قبل وبعد التحميض لمستخلص الصبغة ، إذ يحول الحامض الكلوروفيل إلى فيوفيتين Phaephytin بإزالة الماغنسيوم من جزيء الكلوروفيل) . ولتقدير الفيوفيتين أضف نقطتين من حمض الهيدروكلوريك المخفف إلى خلية الجهاز ، واخلط بقلب الخلية عدة مرات بتغطية فوهة الخلية بورق ألمونيوم ، واتركها في الظلام ١٠ دقائق وأعد قياس امتصاص الضوء على ٧٥٠ ، ٦٦٥ نانومتر .

الحساب :

اطرح كل قراءة على ٧٥٠ نانومتر من القراء على ٦٦٥ نانومتر قبل وبعد التحميض لتعطي قيم الامتصاص المصححة .

تركيز كلوروفيل (أ) بالميكروجرام / لتر = ٢٦,٧ (الامتصاص المصحح قبل التحميض- الامتصاص المصحح بعد التحميض) ×

$$\frac{\text{حجم مستخلص الأسيتون النهائي بالمليلتر}}{\text{حجم عينة الماء المرشحة باللتر} \times \text{طول ممر الضوء في خلية الجهاز بالسنتيمتر}}$$

تركيز صبغات الفيو (فيوفيتين) بالميكروجرام / لتر = ٢٦,٧ [(١,٧ × الامتصاص المصحح بعد التحميض) - الامتصاص المصحح قبل التحميض] ×

$$\frac{\text{حجم مستخلص الأسيتون بالمليلتر}}{\text{حجم عينة الماء المرشحة باللتر} \times \text{طول ممر الضوء في خلية الجهاز بالسنتيمتر}}$$

ولقياس كلوروفيل (أ، ب، جـ) تجرى نفس الخطوات بدون تصحيح لصبغات الفيو ، ويقرأ الامتصاص للمستخلص على ٦٣٠، ٦٤٧ ، ٦٦٤ ، ٧٥٠ نانومتر وتطرح الأخيرة من القراءات الثلاثة الأولى فيكون تركيز كلوروفيل (أ) بالميكروجرام / لتر = ١١,٨٥ (القراءة المصححة على ٦٦٤ نانومتر) – ١,٤٥ (القراءة المصححة على ٦٤٧ نانومتر) – ٠,٠٨ (القراءة المصححة على ٦٣٠ نانومتر) ×

$$\frac{\text{حجم مستخلص الأسيتون بالمليلتر}}{\text{حجم عينة الماء المرشحة باللتر} \times \text{طول ممر الضوء في خلية الجهاز بالسنتيمتر}}$$

وتركيز كلوروفيل (ب) ميكروجرام / لتر = ٢١,٠٣٠ (القراءة المصححة على ٦٤٧ نانومتر) – ٥,٤٣ (القراءة المصححة على ٦٦٤ نانومتر) – ٢,٦٦ (القراءة المصححة على ٦٣٠ نانومتر) ×

$$\frac{\text{حجم مستخلص الأسيتون بالمليلتر}}{\text{حجم عينة الماء باللتر} \times \text{طول ممر الضوء في خلية الجهاز بالسنتيمتر}}$$

وتركيز كلوروفيل (جـ) ميكرجرام / لتر = ٢٤,٥٢ (القراءة المصححة على ٦٣٠ نانومتر) – ١,٦٧ (القراءة المصححة على ٦٦٤ نانومتر) – ٧,٦٠ (القراءة المصححة على ٦٤٧ نانومتر) ×

$$\frac{\text{حجم مستخلص الأسيتون بالمليلتر}}{\text{حجم عينة الماء باللتر} \times \text{طول ممر الضوء في خلية الجهاز بالسنتيمتر}} .$$

ثالثًا : تحليل التربة

الغرض منه تقدير الكاتيونات والأيونات الذائبة في المحلول الأرضي كما يقدر الكاتيونات التبادلية على معقد الطين وأهمها (الكالسيوم ـ المغنسيوم ـ الصوديوم ـ البوتاسيوم) .

كما أنه يجب قياس درجة تركيز أو نشاط أيون الأيدروچين ، ويجرى التحليل أو التقدير الكيميائي على المستخلص المائي أو مستخلص عجينة التربة المشبعة .

طريقة عمل المستخلص المائي :

ـ تؤخذ وزنة في حدود : ٥٠ جم تربة جافة تماماً .

ـ يضاف إليها ٢٥٠سم^{3} ماء مقطراً والرج لمدة ٣٠ دقيقة مع التسخين خفيفاً وتترك فترة .

ـ يرشح من خلال ورقة ترشيح ، وهو في هذه الحالة يحتوي على العناصر الذائبة ، ونسبة التربة إلى الماء ١ : ٥ .

أهم ما يجب قياسه :

ـ تقدير المادة العضوية .

ـ تقدير الكالسيوم المتبادل .

ـ تقدير الكالسيوم الذائب .

ـ تقدير الكالسيوم والماغنسيوم الذائبين .

ـ تقدير الصوديوم والبوتاسيوم لونيا .

ـ تقدير الكلوريد .

ـ تقدير الكربونات والبيكربونات .

ـ تقدير الكبريتات .

ـ النسبة المئوية للأملاح الذائبة .

تقدير المادة العضوية في الأرض :

الفكرة :

أكسدة كمية بسيطة من الأرض بواسطة كمية معلومة الحجم والعيارية من محلول فوق كرومات البوتاسيوم بعد الأكسدة بواسطة محلول كبريتات الحديدوز والأمونيوم .

طريقة العمل :

١ ـ يوزن حوالي ٢ جم أرض وتوضع في دورق مخروطي سعة ٢٥٠سم^{3} .

٢ ـ يضاف ١٠ سم٣ من محلول فوق كرومات البوتاسيوم العياري ثم يضاف ٣٠سم٣ من حامض كبريتيك مركز نقي ويرج لمدة دقيقة ، ويترك ٠,٥ ساعة فيحول حمض يد٢ كب أ٤ فوق كرومات البوتاسيوم إلى حمض كروميك الذي بدوره يؤكسد المادة العضوية ويحولها إلى ك أ٢ .

٣ ـ يضاف ٥ جم من كلوريد صوديوم ثم الرج (لإظهار نقطة التعادل) .

٤ ـ يضاف ١٠–٢٠ نقطة دليل داي فينيل أمين ، إذا لم يتكون اللون الأزرق يضاف ١ سم٣ بالضبط فوق كرومات البوتاسيوم العياري حتى يزرق .

٥ ـ ينقط بمحلول كبريتات الحديدوز والأمونيوم العيارية حتى يتحول إلى أخضر زاهي.

٦ ـ يلاحظ أن حوالي ٧٦٪ من المادة العضوية هي التي تم أكسدتها إلى ك أ٢ .

نسبة الكربون = (ملليمكافئات المؤكسد − ملليمكافئات المختزل) ÷ (وزن العينة × ٠,٧٦٥) × ٠,٠٠٣ × ١٠٠

حيث ملليمكافئات المؤكسد = حجم المحلول × قوته

وملليمكافئات المختزل = حجم كبريتات الحديدوز النشادرية × قوتها .

النسبة المئوية للمادة العضوية في الأرض = ٪ للكربون × ١,٧٢٤ . حيث ١,٧٢٤ = معامل تحويل الكربون لحساب المادة العضوية ، حيث إن نسبة الكربون للمادة العضوية ٥٨٪.

تقدير الكالسيوم المتبادل :

١ ـ يؤخذ ٥ جم تربة + ٢ جم كاك أ٣ نقية + ١٠٠ سم٣ كاكل٢ (عياريته ١) بكأس.

٢ ـ يقلب المخلوط على فترات لمدة ٠,٥ ساعة ويوضع الكأس على حمام مائي لمدة ٠,٥ ساعة مع مراعاة التقليب من وقت لآخر وتركه ليلة في المعمل .

٣ ـ ينقل المخلوط في اليوم التالي إلى قمع غسيل بواسطة محلول ص كل عياري بحيث يستقبل الراشح في دورق معياري سعة ٥٠٠ سم٣ .

٤ ـ يؤخذ ٢٥سم٣ من الدورق المعياري + ٥٠سم٣ ماء مقطراً + ٢٠سم٣ أكسالات أمونيوم ثم يضاف من ٢–٣ نقط من دليل الميثيل البرتقالي والتسخين على ٦٠–٧٠ °م ثم ينقط بمحلول النشادر (١:١) حتى يتحول لون الدليل إلى البرتقالي الخفيف ثم يسخن دقيقتين أو ٣ دقائق حتى يرسب الراسب بالقاع PH ٣,٦ .

٥ ـ يترك الكأس لمدة ساعة على حمام مائي ثم يختبر لتمام الترسيب بوضع نقطة أكسالات .

٦ ـ ينقل محتويات الكأس إلى ورقة ترشيح مع غسيل الراسب في الكأس وعلى ورقة الترشيح بماء مقطر ساخن حتى تمام التخلص من الكلورين والأكسالات .

٧ ـ يضاف ٣٠سم٣ يد٢كب أ٤ مخفف ساخن لإزالة راسب أكسالات الكالسيوم على ورقة الترشيح مع استقبال المذاب في الكأس السابق الترسيب فيه ثم تغسل ورقة الترشيح بماء مقطر .

٨ ـ يسخن حتى ظهور أول فقاعة قبل الغليان ثم المعادلة بمحلول برمنجنات معلوم العيارية حتى يتحول اللون إلى وردي خفيف .

٩ ـ توضع ورقة الترشيح في الكأس مع الغسيل بقليل من الماء حتى يزول اللون الوردي .

١٠ ـ استمر في التنقيط بمحلول برمنجنات على الكأس حتى اللون الوردي الضعيفة .

١١ ـ من حجم البرمنجنات المستعملة يمكن حساب كمية الكالسيوم على أساس :
١سم٣ من برمنجنات البوتاسيوم العيارية =٠٢, جم كالسيوم .

تقدير الكالسيوم الذائب :

١ ـ يؤخذ ٥سم٣ من المحلول في جفنة .

٢ ـ يخفف المحلول بحوالي ١٠سم٣ ماء مقطراً .

٣ ـ يضاف ١,٥سم٣ من ص أ يد أو ن يد٤ أ يد والدليل الميروكسيد .

٤ ـ تجرى المعادلة بالتنقيط بواسطة محلول الفرسين EDTAL حتى اللون البنفسجي .

مقدار الكالسيوم ملليمكافئ / لتر = حجم الفرسين × قوته × عامله × ١٠٠٠ (١)

مقدار الكالسيوم ملليمكافئ في ١٠٠جم تربة= حجم الفرسين×قوته×عامله× ٢٥٠/٥ × ١٠٠/٥٠

تقدير الكالسيوم والمغنسيوم الذائبين :

يلزم وجود دليل Eriochrom Black'T ويحضر بإذابة ٥, جم من الدليل + ٤,٥جم هيدروكسيل أمين هيدرو كلوريد في ١٠٠سم٣ كحول إيثايل ٩٥٪ مع وجود محلول منظم من ٦٧,٥ كلوريد أمونيوم ذائب في ٥٧٠جم أمونيوم هيدروكسيد مع معايرته بالفرسين .

الطريقة :

٥سم٣ من المحلول المراد قياسه + ١٠سم٣ ماء مقطر + ٥سم٣ محلولاً منظماً + ٤ نقط من الدليل والتنقيط بالفرسين حتى انتهاء التفاعل وهو اللون الأزرق .

الحساب :

كا + مع = حجم الفرسين × قوته × عامله × ١٠٠٠/٥ (٢)

كا + مع في ١٠٠جم تربة = الفرسين × قوته × عامله × ٢٥٠/٥ × ١٠٠/٥٠

ويمكن حساب كمية الماغنسيوم بطرح (١) من (٢) .

تقدير الصوديوم والبوتاسيوم لونيا :

المحاليل اللازمة :

١ ـ خلات أمونيوم ١ ع .

٢ ـ أ ـ كلوريد صوديوم ٠٤,ع في حالة تقدير الصوديوم .

ب ـ كلوريد بوتاسيوم ٠٢,ع في حالة تقدير البوتاسيوم .

٣ ـ كلوريد صوديوم أو بوتاسيوم في محلول عياري من خلات الأمونيوم .

٤ ـ كلوريد الليثيوم ٠٥,ع .

يحضر محاليل قياسية ومتدرجة التركيز من محلول ٢أ & ٤ أو ٢ب & ٤ تحتوي على نفس التركيز من كلوريد الليثيوم وأفضل تركيز منه هو من ٥–١٠ ملليمكافئ .

طريقة العمل :

١ ـ يؤخذ حجم من المحلول بحيث يحتوي على ٠,٢ ملليمكافئ صوديوم أو ١,٠ ملليميكافئ بوتاسيوم ويوضع في دورق معياري سعته ٥٠سم٣ .

٢ ـ يضاف إليها مقدار من محلول الليثيوم بحيث يعطي عند التخفيف إلى ٥٠سم٣ تركيزا يساوي بالضبط ما يوجد بالمحلول القياسي من ص كل أو بوكل .

٣ ـ يخفف بالماء المقطر إلى٥٠ سم ٣ ويقدر تركيز الصوديوم أو البوتاسيوم باستخدام جهاز الكلرميتر والمنحنى المرسوم .

ملليمكافئ ص / لتر محلول = (ملليمكافئ الصوديوم / لتر المقدر من المنحنى ÷ حجم العينة المأخوذ) × ٥٠

ملليمكافئ بو / لتر محلول = (ملليمكافئ بو من المنحنى ÷ حجم العينة) × ٥٠ .

تقدير الكلوريد :

١ ـ يؤخذ ١٠ سم٣ من المستخلص بالضبط في جفنة ويخفف بحوالي ١٠سم٣ ماء مقطراً ويضاف من ٢–٣ نقطة كرومات البوتاسيوم .

٢ ـ ينقط المحلول بواسطة نترات الفضة ببطء مع التقليب المستمر حتى لون أحمر جلدي لايذوب بالتقليب .

كلوريد التربة = حجم نترات الفضة × ع × (٣٥٥ ÷ ١٠٠٠) × (٢٥٠ ÷ ١٠) × (١٠٠ ÷ ٥٠ (وزن الأرض))

تقدير الكربونات والبيكربونات :

١ ـ يؤخذ بالماصة ٢٥سم٣ من المستخلص + ٤٠سم٣ ماء مقطراً + ١٠ نقط من دليل فينولفيثالين في دورق .

٢ ـ تملأ السحاحة بحمض يدكل معلوم العيارية وينقط منها على الدورق حتى إن نقطة

واحدة منه تزيل اللون الأحمر للفينولفيثالين .

٣ ـ يصرف الحجم المستهلك من الحمض ثم يضاف ٢-٣ نقطة من دليل الميثيل البرتقالي إلى الدورق ثم المعادلة بالحامض مرة أخرى حتى ظهور اللون الأحمر مرة أخرى .

حجم الحامض المستهلك مع الفينولفيثالين أ وعياريته ١, .

حجم الحامض المستهلك مع الميثيل البرتقالي ب وعياريته ٠١,

٪ ص $_٢$ك أ$_٣$ بالتربة = ح الحمض أ × ع × ٢ × $\frac{٥٣}{١٠٠٠}$ × $\frac{٢٥٠}{٢٥}$ × $\frac{١٠٠}{٥٠}$

٪ ص يدك أ$_٣$ بالتربة = ح الحمض ب × ع × ٢ × $\frac{٨٤}{١٠٠٠}$ × $\frac{٢٥٠}{٢٥}$ × $\frac{١٠٠}{٥٠}$

تقدير الكبريتات :

ترسيب الكبريتات بواسطة باريوم كلوريد ثم يحرق الراسب ويوزن وتحسب فيه كمية الكبريتات .

١ جم من الراسب يحتوي على $\frac{٩٦,٠٦}{٢٣٣,٤٢}$ = ٤١٥, جم كبريتات فقط .

طريقة العمل :

١ ـ يؤخذ ٢٥سم^٣ من المستخلص ويخفف بحوالي ٤٠سم^٣ ماء مقطراً ثم يضاف قليل من حمض يدكل مخفف ٣سم^٣ ثم يسخن لقرب الغليان .

٢ ـ يضاف للمحلول الساخن ٢٥سم^٣ من محلول باكل$_٢$ ٥٪ الساخن نقطة نقطة بالتقليب باستمرار .

٣ ـ يغطى الكأس ويوضع على حمام مائي ويترك ساكنا لمدة ساعتين حتى يتكون الراسب تماماً في القاع .

٤ ـ ينقل الراسب من الكأس على ورقة ترشيح عديمة الرماد مع مراعاة غسيل الراسب في الكأس وعلى ورقة الترشيح بماء مقطر ساخن حتى يخلو الراسب من الكلوريد .

٥ ـ جفف ورقة الترشيح وما عليها من راسب ثم احرقها في بوتقة ثابتة الوزن مراعيا أن ترتفع الحرارة بالتدريج حتى بدء الاحمرار .

٦ ـ برد البوتقة في مجفف ثم الوزن وتكرر هذه العملية حتى ثبات الوزن .

٧ ـ من وزن راسب كبريتات الباريوم احسب وزن الكبريتات .

الحساب :

٪ للكبريتات على صورة ص$_٢$كب أ$_٤$= وزن الراسب ×٤١١٥× $\frac{١٤٢,٠٦}{٩٢,٠٦}$ × $\frac{٢٥٠}{٢٥}$ × $\frac{١٠٠}{٥٠}$

تقدير النسبة المئوية للأملاح الذائبة الكلية في الأرض :

١ ـ يؤخذ ٢٥سم^٣ من المترشح الرائق وتوضع في جفنة معلومة الوزن ثم تبخر على

حمام مائي حتى تمام الجفاف .

٢ ـ تجفف الجفنة بما فيها في فرن كهربائي على درجة ١٠٥°م وتترك ليلة ثم يكرر التجفيف والتبريد والوزن حتى ثبوت الوزن .

٣ ـ تحسب نسبة الأملاح في العينة ومنها يمكن حساب النسبة في الأرض .

$$\text{الأملاح الذائبة بالعينة} = \text{وزن العينة بعد ثبات وزنها} \times \frac{٢٥٠}{٢٥} \times \frac{١٠٠}{\text{وزن الأرض}}$$

ويمكن الرجوع لما يلى من مراجع للزيادة :

– كاظم مشجوت عواد (١٩٨٦) مبادئ كيمياء التربة ـ جامعة الموصل .

– محمود إبراهيم فهمى (وآخرون) : تجارب عملية فى أساسيات علم الأرض – دار المعارف بمصر (١٩٦٥) .

– نور طاهر الطيب ، بشير محمود جرار (١٩٨٨) : قياس التلوث البيئى – دار المريخ للنشر – الرياض .

-Boyd , C.E. (1981) Water Quality in Warmwater Fish Ponds Auburn Univ . , Agric - Exper Station - Alabama .

- Carlberg , S. (1967) FAo Fisheries Technical Paper No . 137 .

- Kraay , G.W. Et al (1992) J. Phycol ., 28 : 708 .

- Laevastu , T . (1965) FAO Manuals in Fisheries Science , No .1, Fascicule 1 & 9 , FAO , Rome .

- Lima dos Santos , C.A.M. et al . (1981) FAO Fish . Tech . Pap . No . 210 .

- Rangana, S. (1979) Manual of analysis of fruit and vegetable products . Tata Mc . Graw - Hil , New Delhi .

- Stirling , H.P. (1985) Chemical and Biological Methods of Water analysis For Aquaculturalists. Institute of Aquaculture, Univ of Stirling, Scotland .

- West, T.S. & Nurnberg , H.W. The Late (1988) The Determination of trace metals in natural waters. Blackwell Scientific Publications , Oxford .

- Woyewode ,A.D. et al . (1986) Can . Tech Rep. Fish . and Aquatic Sci. No . 1448 .

الباب الرابع

التحليل الميكروبيولوچى

الفصل الأول

مـواد العلـف

يؤدي الفحص الميكروبيولوجي لمواد العلف للوقوف على مدى سلامتها وصلاحيتها للعلف من عدمه ، وإذا ما كانت تتسبب في الإضرار بصحة الحيوانات المغذاة على مثل هذه المواد . وقد ترى النموات الفطرية في بعض الحبوب الفردية ، فتعد الحبوب المنبتة وتفحص الجذور والإنبـاتات ، ثم تفـرد الحبـوب في طبق بتـري معـقـم على ورق ترشيح مرطب، ثم تغطى بورق ترشيح مبلل في الغطاء كذلك (ولا يسمح بزيادة استخدام الماء والإيعاق الإنبـات) . يحفظ الطبق على حرارة الغرفة (حوالي ٢٠م) ، ويفحص الطبق يوميا أو كل يومين ، وتفحص بالنسبة للرائحة وظهور فطريات العفن وكذا بناء إنباتات وجذور . فإذا أنبتت ٩٠-١٠٠٪ من الحبوب بهذه المعاملة دون عفن تكون العينات ذات جودة عالية ، وإذا لم ينبت عدد كبير من الحبوب فإن الجودة عادة تكون سيئة نتيجة حصادها رطبة أو تخزينها طويلاً قبل التجفيف ، ففي هذه الظروف تنبت في أكياسها وبالتجفيف تتحطم الإنباتات .

الحبوب التالفة (كالحنطة والشعير المخزون) تعد من الخطورة بمكان على صحة الحيوانات ، لارتفاع محتواها من الفطر والبكتريا ، فالعدوى الثانوية ببكتريا كلوستريديوم برفرنجنس Clostridium perfringens من النوع (D) تؤدي إلى حالات وفاة فجأة .

ولإجـراء الفـحص الكامل مـيكروبيـولوچيـا يحـتـاج ذلك إلى مـتـخـصـصـين في الميكروبيـولوجي، أو إلى مـتـخـصص بكتـيـريا ، ومـتـخـصص فطريات ، وهكذا لإجـراء الميكروتكنيك الخاص الذي يؤدي للتعرف على العدّ الميكروبي ، والتصنيف الميكروبي للأجناس والأنواع لتحديد كم ونوع الكائنات المرضية ، وإذا ما كانت قادرة على إنتاج سمومها من عدمه . وفي ذلك يستعمل المتخصص كثير من الأدوات والأجهزة التي منها : الشرائح الزجاجية بأنواعها وأغطيتها وعلبها ، أحواض صبغ ، مخابير ، ماصات ، جواهر كشافة ، أقلام شمع ورصاص وحبرشيني ، أجهزة تعقيم ، مسطحات تسخين ، موقد كحولي ، مجاهير ، ... إلخ .

ولا تلعب البكتريا وسمومها دوراً كبيراً في التلف الميكروبي لمواد العلف كما تلعب الفطريات . وليكون الفحص البكتيري لمواد العلف ذا جدوى فينبغي مراعاة التعرف على أجناسها بجانب العد الكلي . إذ أنه ليست كل الكائنات الحية الدقيقة ضارة بل إن أنواعاً

وأشكالا معينة منها فقط هي الضارة. فنجد أن بالشوفان يصل العدد البكتيري أعلى من ١٠ مليون/جرام عقب الحصاد وهو رقم طبيعي إلا أن معظمه من البكتيريا الخاصة بالحبوب وغير الضارة وتسمى بالبكتيريا الصفراء من عائلة Achromobacteriaceae . إلا أن تكوين الفلورا الثانوية (Bacilles, Micrococces, Clostridium, Enterobacteriaceae, Pseudomonaden) تؤدي إلى الفساد . وعموماً فإنه من الطبيعي أن نجد حتى ١–٥ مليون بكتيريا وحتى ١٠٠,٠٠٠ وحدة بانية للمستعمرات الفطرية في كل جرام علف وذلك في مختلف أنواع الحبوب .

وعموماً فإن النتيجة الموجبة للكشف عن السموم له أهميته الكبرى عن الكشف عن البكتيريا ، إذ أن الفلورا تتعرض لعديد من التأثيرات المستمرة . (موت البكتيريا ـ السيلچة ـ التكعيب ـ التعقيم) وعليه فقد لا يمكن إعادة الكشف عن العدد الميكروبي ، أو قد لا تتوافر ظروف بناء التوكسينات (حرارة ـ مادة العلف ـ نسبة ك أ٢ / أ٢) . وعليه فإن النتيجة الموجبة للكشف عن التوكسين تعطي مؤشراً لتواجد ظروف إنتاج توكسينات أخرى كذلك ونظراً لصعوبة تحديد الحدود المسموح بها لعدد البكتيريا في مواد العلف فإن النقاش يدور حديثاً فقط حول مشكلة السالمونيلا . وفيما يلي جدولاً بالعدّ الميكروبي للأعلاف التالفة وغير التالفة :

مادة العلف	عدد ميكروبي طبيعي لعلف طازج		عدد ميكروبي عالي لعلف أقل طزاجة		عدد ميكروبي عالي جداً لعلف تالف	
	بكتيريا مليون/جم	فطر ألف/جم	بكتيريا مليون/جم	فطر ألف/جم	بكتيريا مليون/جم	فطر ألف/جم
مساحيق دم أو لحم أو عظم	< ١	< ١٠	١–٤	١٠–٤٠	> ٤	> ٤٠
مسحوق سمك	< ٢	< ٢٠	٢–٥	٢٠–٥٠	> ٥	> ٥٠
رجيع وحبوب (عدا الذرة)	< ٦	< ٨٠	٦–١٠	٨٠–٢٠٠	> ١٠	> ٢٠٠
ذرة	< ٤	< ٥٠	٤–٨	٥٠–١٠٠	> ٨	> ١٠٠
مخلفات مطاحن	< ٣	< ٤٠	٣–٦	٤٠–٨٠	> ٦	> ٨٠
مخلفات معاصر	< ٢	< ٥٠	٢–٤	٥٠–١٠٠	> ٤	> ١٠٠
كسب صويا	< ١	< ٢٠	١–٤	٢٠–٨٠	> ٤	> ٨٠

والجدول السابق يوضح القيم الإرشادية للحكم على مادة علف ما من حيث صفاتها الصحية الميكروبيولوچية ، أو التلف الحادث لها طبقاً للعد الميكروبي (فطر ، بكتيريا) .

وقد قُدر العدّ الميكروبي بطرق مختلفة (سواء بطحن المادة العلفية أو تطريتها أو بإضافة آجار لمعلق الجراثيم) لعديد من مواد العلف التجارية ولخصت كالتالي :

مـــادة العلف	العـــــدد الميـكروبي	
	فطـــر / جم	بكتيريا مليون / جم
علف ماشية حلابة	١٠٠ - ٥٧٥٠٠	٠,٠٢ - ١,٣٠
علف عجول	٤٠٠ - ٥٥٠	٠,٢٠
علف دجاج بياض	٣٣٠٠ - ٨٤٠٠٠	٠,٢٠ - ٣,٥٠
علف كتاكيت بادئ	٨٥٠٠ - ١٠٧٠٠	١١,٠٠
علف كتاكيت بدارى	٠٧٥٠ - ١٠٠٠	٠,٠٨ - ٠,١٥
علف كتاكيت تسمين	٣٦٠٠ - ١٠٠٠٠	٠,٥٠ - ٤٠,٠٠
علف خنازير تسمين	١٠٠ - ٣٥٠٠٠٠	٠,٤٠ - ٢,٠٠
كسب قطن مكعبات	١٩٠٠٠٠ - ٣٠٠٠٠٠٠	٢,٠٠ - ٨,٠٠
مركزات بروتين	٥٠٠	٠,٠١ - ٠,٠٤
فول صويا مطحون	٥٠٠	٠,٤٠ - ٠,٧٠
ذرة مطحونة	١٦٠ - ١٢٥٠	٠,١٠ - ٠,٢٠
نخالة قمح	١١٠٠٠ - ١١٢٠٠	٠,١٠ - ٠,٥٠
مسحوق سمك	٨٢٥٠ - ١٠٠٠٠	٠,٠٥ - ٠,٠٦

وتميز مواد العلف التالفة بفعل الميكروبات بنمو بكتيريا معينة وتراكم النواتج الميتابوليزمية للبكتيريا والفطر ، وعدد البكتيريا لا يغير بمفرده طزاجة مادة العلف ، أو يحكم على تلفها بل من المهم كذلك التعرف على أنواع البكتيريا والفطريات السائدة في مادة العلف . ومن الممكن تقسيم مادة العلف إلى ثلاث درجات من التلف تسود في كل منها بعض الكائنات الحية الدقيقة المميزة لكل درجة تلف ، ومن الأهمية التعرف عليها إذ أن تراكمها في مادة علف يعطي خلفية عما يمكن تواجده من سمومها التي قد تؤذي الحيوان بالتغذية عليها .

وأهم هذه السموم هى السموم الفطرية Mycotoxins بسبب تأثيراتها الدموية Haematic أو الكلوية Nephritic أو الكبدية Hepatic أو الجلدية Dermatic أو العصبية Neurotic السامة وكذلك لنشاطها السرطاني Carcinogenic والتشويهي Teratogenic أو الاستروجيني Oestrogen-ic.

ودرجات التلف الثلاثة لمادة علف تزيد فيها العدّ الميكروبي تدريجيا من أول درجة إلى ثالث درجة تلف، حتى لا تجد الكائنات الحية عناصر غذائية في مادة العلف فيبدأ العدّ الميكروبي يتناقص بعد أن وصل إلى درجة تشبع لا يستطيع الزيادة عدديا بعد ذلك بل لا تستطيع التمثيل الغذائي فيموت جزء كبير منها ، أو تتأثر بإنزيمات خلاياها فيقل العدّ الميكروبي عن ثاني درجة تلف للعلف، وهذا دليل على تمام التلف . وتظهر رائحة الأمونيا وكبريتيد الهيدروچين نتيجة معدنة المادة العضوية ، وهنا يكون التلف الميكروبي لمادة العلف ليس من الصعب ملاحظته بالعين المجردة .

ورغم ارتفاع العدّ الميكروبي في الحبوب عن الأعلاف حيوانية الأصل إلا أن هجوم الكائنات الحية الدقيقة للحبوب أقل عن هجومها للأعلاف ذات الأصل الحيواني لحماية الأولى بجدر الثمرة أو الحبة ، وهو ما لا يتوفر في المنتجات الحيوانية نتيجة تصنيع مادة جسم الحيوان بالماكينات، ، علاوة على سهولة مهاجمة البروتين الحيواني (نتيجة دنترته Denaturation جزئيا (إنزيمياً)) من قبل الميكروبات .

الأعلاف النباتية السليمة أو مخاليطها الغنية بالحبوب تحتوي Achromobacteriaceen ، وطالما أن العدّ الميكروبي في حدود مليون / جم فليس لها قيمة ، كما أن الفطريات تكون أقل من ١٠٠٠ جرثومة / جم ، وهي من أنواع مختلفة علاوة على وجود الخمائر . أما الأعلاف النباتية ذات أول درجة من التلف فإنها تحتوي على بكتريا رمية كالكوكس والباسيللس، والعدّ الميكروبي لا يتعدى عدة ملايين / جم ، وعندما تنتشر الفطريات على الأخص الاسبرجيللس (من مجاميع كانديدس أو جلاوكس) فهذا دليل لبداية التلف ، والعدّ الفطري يقع ما بين ١٠٠٠٠ إلى ١٠٠٠٠٠ جرثومة / جم ، ولا توجد الخمائر في هذه الحالة باستثناء في السيلاج ونابت الشعير . ثاني درجة من التلف تتميز بسيادة الكوكس الرمي والبزيدومونادسيا والباسيللس كالكوليستريديا بأعداد أكبر من ١٠ مليون/جم، مع عد فطري أعلى من مائة ألف جرثومة Spores لكل جرام علف معظمها اسبرجيللس وبنسيليوم وإذا زاد العدّ الفطري عن مليون / جم فإن العلف لا يصلح للتغذية ويبدو عليه التلف ماكروسكوبيا بوضوح .

أما الأعلاف ذات الأصل الحيواني فتختلف كائناتها الحية لفقر الأعلاف هذه في الكربوهيدرات عن الأعلاف النباتية ، لكن في الأعلاف الحيوانية المصابة بالدرجة الأولى من التلف تنتشر بها الكوكس الرمي والباسيلليس بشدة كذلك استربتوكوكس بكثرة مع ضآلة الفطريات . أما في ثاني درجة من التلف فتنتشر بها نفس الأنواع المثيلة في الأعلاف النباتية ويصل عدّها لمدى الملايين من البكتيريا .

ومن البكتريا البانية للسموم في مواد العلف مايلي :

البكتيريا	وجـــودهـا
Clostridium botulinum	أعلاف كالسيلاج، بديلات اللبن، رقائق البنجر، السمك، الروث.
Staphylococcus aureus	اللبن ومنتجاته .
Bacillus cereus	أعلاف رطبة غنية بالبروتين .

بينما من البكتيريا الموجودة في مواد العلف والتي تكون سمومها في الحيوان وليس في العلف ما يلي :

البكتيريا	وجـــودهـا
Salmonella	كل مواد العلف الممكنة خاصة الحيواني منها .
Escherichia coli (Pathogenic)	كل مواد العلف .
Clostridium perfringens	مواد العلف الرطبة الغنية بالبروتين .
Listerien	سيلاج .

الفطريات والخمائر والبكتيريا :

نتيجة القذارة وسوء التخزين تتلوث مواد العلف بمواد حيوية خارجية كالفطريات والخمائر والبكتيريا مما يجعل مواد العلف غير مقبولة أو ضارة . بنمو الفطريات تتحطم أنسجة مواد العلف لتكوين العفن . ويصاحب هذه النموات تلفاً لمادة العلف في مواصفاتها الطبيعية (الميكانيكية واللون والرائحة والطعم) والكيماوية (زيادة رمادها وانخفاض محتوياتها من المواد العضوية وتخليق نواتج سامة) .

ويجرى فحص هذه الكائنات باستخدام ميكروسكوب وشريحة عد (تشبه شريحة عد كرات الدم Haemocytometer) بعمل مستخلص مائي لعينة العلف وتخفيفه إلى حجم معلوم ويؤخذ منه قطرة على الشريحة وتغطي بغطاء شريحة وتفحص تحت الميكروسكوب في ضوء النهار للتعرف على أنواع هذه الكائنات وعدد كل منها .

وقد يجرى اختبار حيوي للفطريات باستخدام طريقة فلورسنت (فلورسين دي اسيتات ـ اثيديم بروميد) حيث تظهر الخلايا الفطرية الحية فلوروكروماسين ، أي تراكم خلوي من الفلورسين ، والذي يظهر بلون أخضر تحت ميكروسكوب ذي أشعة فوق بنفسجية ، بينما الخلايا الميتة تظهر لوناً أحمر فاتحاً والذي يرجع لدخول اثيديم بروميد . فهناك ارتباط جيد بين هذا الاختبار وطريقة عد المستعمرات الفطرية ، علاوة على أن هذا الاختبار سريع

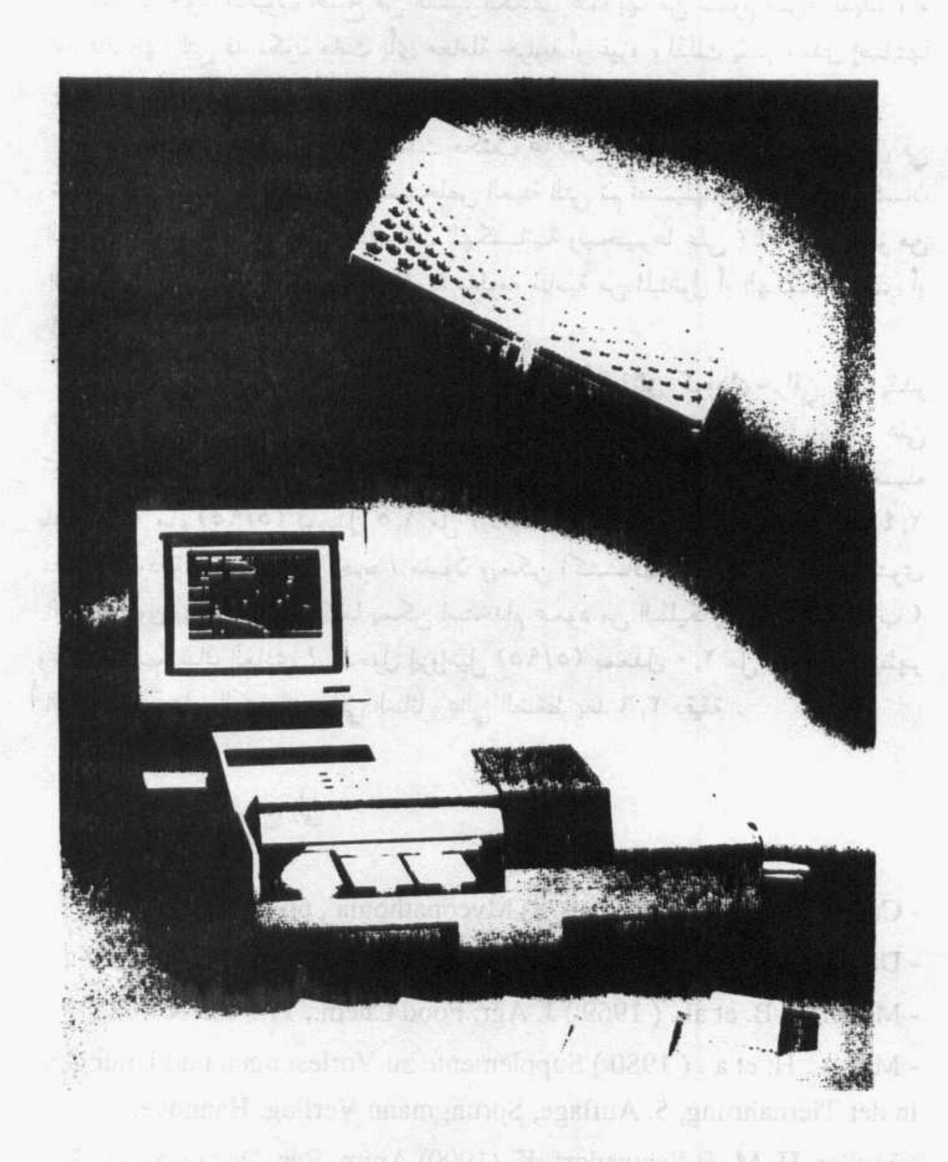
وحساس جداً وبسيط .

وإذا كان الفحص الميكروسكوبي يفيد في عد الجراثيم الحية للفطريات فإن تتبع الدلائل الكيماوية (كالكيتين في جدر خلايا الفطريات ، ارجوستيرين(أكثر الاستيرينات تواجداً في الفطريات) C يساعد كثيراً في تقدير كتلة الفطريات (النمو الفطري) في مواد العلف .

وتستخدم الطرق التحليلية الحديثة (كجهاز تحليل الأحماض الأمينية) المبنية على تقدير الكيتين (بوليمر للجلوكوز أمين) وذلك للكشف عن الفطريات غير الحية في الأغذية والتي قد تكون أنتجت سمومها قبل موتها .

وهناك جهاز تحليل للميكروبيولوجي Microbiology Analyzer يمكن من رسم منحنيات نمو لأى كائن حي دقيق مع قياس العكارة الناتجة من نموه وينجز عمل عام في أسبوع واحد .

ويستخدم اختبار Limulus للكشف السريع عن جودة الأعلاف واللحوم ومنتجاتها ميكروبيولوجيا ، لتقدير البكتريا السالبة لصبغة جرام (ومعظمها انتيرو باكتيريا وبزيدوموناداً) كعد كلي للخلايا الحية والميتة وذلك في ظرف حوالي ٩٠ دقيقة . ويعتمد هذا الاختبار على التفاعل بين التوكسين الداخلي (ليبوبولي سكاريد LPS) كمكون في الجدار الخلوي الخارجي للبكتيريا السالبة للجرام ، وذلك مع ليسات خلايا الأميبة (خلايا الدم) من Limulus Polyphemus على رقائق تقدير الاندوتوكسين بالمعايرة والتي تحدد المحتوى من الإندوتوكسين والذي بدوره يرتبط بعدد البكتيريا السالبة للجرام . وهذا الاختبار واحد من الاختبارات السريعة للعد البكتيري المتوفرة.. في الأسواق حاليا في صورة Kits سابقة التحضير وسهلة وسريعة الأداء .



Microbiology Analyzer

(شكل ٣٥) جهاز تحليل للميكروبيولوجي

فلتقدير جودة الحبوب أصبح من العسير الكشف عما بها من سموم فطرية عديدة ، أو عد فطرياتها التي قد تكون ماتت بأي معاملة حرارية أو غيره ، لذلك يقدر معدل إصابتها بالفطريات عن طريق تقدير أحد نواتج الفطريات كدليل كيماوي وهو الإرجسترول .

فيتم تصبين العينات مع قلوي تحت مكثف عاكس لوجود جزء من الإرجسترول في شكل استر في خلية الفطر ، ثم تستخلص العينة التي تم تصبينها باستخدام الهكسان العادي بالرج ، وجمع المستخلصات الهكسانية وتبخيرها على ٤٠°م تحت جو من النيتروچين ، ثم تنقل المتبقيات في كمية معلومة مناسبة من الميثانول أو الهكسان العادي أو البنزين أو كلوريد ميثيلين / ايزوبروبانول .

وقد ينقى المستخلص على عمود من السليكاچيل أو رقائق كروماتوجرافي ، ثم يقدر الإرجسترول على سبكتروفوتومتر على طول موجة ٢٨٢ نانومتر ، أو يفصل ويقدر على كروماتوجرافي سائل عالي الضغط على نفس طول الموجة باستخدام عمود (C-8) وغسيله بالميثانول / ماء (٥/٩٥) بمعدل ١,٥ مل / دقيقة فيظهر منحنى الإرجسترول بعد ٢,٤ دقيقة . ودقة الكشف ٠,١ جزء / مليون ويمكن اكتشاف ٨٤-١٠٢٪ من محتوى الإرجسترول بهذه الطرق . كما يمكن استخدام عمود من السليكاچيل (ليكروسورب) وغسيله بالهكسان العادي / كحول إيزواميل (٥/٩٥) بمعدل ٢,٠ مل / دقيقة فيظهر الإرجسترول على الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط بعد ٣,٦ دقيقة .

ولمزيد الايضاح يرجع إلى :

- Calich , V. L. G. et al . (1978) Mycopathogia , 66 : 175 .
- Dickens, J. W. & Welty, R. E. (1975) J. Aocs, 52 : 448 .
- Marsh, P. B. et al . (1969) J. Agr. Food Chem., 17 : 462 & 468.
- Meyer , H. et a . (1980) Supplemente zu Vorlesungen und Ubungen in der Tiernahrung, 5. Auflage, Sprungmann Verllag, Hannover.
- Muller, H. M. & Schwadorf, K. (1990) Anim .Res. Develop., 31: 71.
- Thalmann, A. & Moller, J. M. (1973) Die Bodenkultur, 24 : 402 .

الفصل الثاني

سائل الكرش

أولاً : بروتوزوا الكرش :

١ ـ فصل هدبيات الكرش من محتويات الكرش :

تطرد محتويات الكرش مركزيا ٣ دقائق ، ويزال معظم الرائق . أضف ١٠ مل من الراسب إلى ٤٠ مل محلول سكروز ٣٠٪ في أنبوبة اختبار سعة ٥٠ مل ، اطرد مركزيا ٣ دقائق ثم يزال الرائق . اغسل الراسب المحتوي على الهدبيات بالطرد المركزي ٣ مرات × ٥ دقائق مع محلول كلوريد صوديوم ٠,٩ ٪ .

٢ ـ صبغ وتثبيت هدبيات الكرش للميكروسكوب :

أ ـ محلول ملح ـ فورمالين ـ أخضر ميثيل (MFS) مفيد جداً للتعرف على الهدبيات ويتكون من :

- ١٠٠ مل فورمالين ٣٥٪ .
- ٩٠٠ مل ماء مقطراً .
- ٠,٦ جم أخضر ميثيل .
- ٨,٠ جم كلوريد صوديوم .

ويبدو لونه أخضر غامقاً ، ويخزن في مكان مظلم ، وإلا يتحول من أخضر ميثيل إلى بنفسجي ميثيل أقل قدرة على الصبغ . عند إضافة العينة بمقدار ٥-١٠ أضعاف حجم محلول MFS فإنه يصبغ فقط أنوية الهدبيات . وتفحص العينة بعد ٣٠ دقيقة على الأقل من إضافة محلول MFS ، حيث إن قبل ذلك تكون الصبغة ضعيفة . العينات المصبوغة بهذا المحلول والموضوعة في ظلام تظل صالحة لمدة ٣ سنوات على الأقل . والمحلول ذاته يمكن حفظه طويلاً .

ب ـ محلول ملح ـ فورمالين ـ أزرق تريبان (TBFS) يستخدم لتمييز الهدبيات الحية عن الميتة في الكرش ، ويتكون هذا المحلول الأزرق الداكن من :

- ١٠٠ مل فورمالين ٣٥٪ .
- ٩٠٠ مل ماء مقطراً .
- ٢ جم أزرق تريبان .

٨ جم كلوريد صوديوم .

وعند إضافة العينة بمقدار ٥-١٠ أضعاف حجم محلول TBFS تتلون أنوية الكائنات الحية بلون أزرق فاتح ، بينما باقي أجزاء الجسم لا تتلون أو تتلون قليلاً جداً ، أجسام الكائنات الميتة تتلون بلون أزرق داكن ؛ لذا يجب فحص العينة سريعاً في ظرف يومين من التثبيت . والمحلول ذاته يحفظ طويلاً .

٣ ـ عد الهدبيات :

يعبر عن عدد هدبيات الكرش عامة كعدد / مل محتويات كرش . ولما كانت التصفية تقلل عدد الهدبيات ، فإنه يفضل العدّ بدون معاملة للعينة ، أو على أقصى تقدير تصفي خلال طبقة واحدة من الشاش . وأفضل العينات لعد الهدبيات هي المعاملة بمحلول MFS . ويجرى العدّ باستخدام شرائح عدّ بلانكتون أو هيموسيتوميتر . تخلط العينة المخففة جيدا ، وتسحب بماصة ١ مل مدرجة ، يوضع منها ٠,١ مل على أخاديد شريحة عد البلانكتون (التي تتباعد عن بعضها بمسافة ٠,٥ م) . غط بغطاء شريحة . عدّ أسفل ميكروسكوب بتكبير × ١٥٠ أو × ٢٠٠ . تعد العينة على ١٠ أقسام فيما بين خطين ، مع عد الهدبيات التي على الأخاديد لليمين أو لليسار فقط . احسب عدد الهدبيات/ مل محتويات كرش من المعادلة :

ع = ٧٢ × ت × م .

حيث ع = عد الهدبيات / مل سائل كرش .

ت = تعداد الهدبيات في ١٠ أقسام من شريحة عد البلانكتون .

م = معامل تخفيف العينة .

وقد تعد بروتوزوا سائل الكرش بأخذ ١ مل من عصير الكرش مع ٢ مل محلول فورمالدهيد ١٠ ٪ (الذي يحتوي ٣٠ مل جليسرين + ٣٠ مجم أخضر ميثيل لكل ١٠٠ مل) مع ٢ مل محلول جليسرين مخفف (٣٠٪) ، فيكون المحلول الأصلي قد خفف بنسبة ١ : ٥ . وباستخدام شريحة العد Fuchs - Rosenthal حجم فراغات العد بها ١ × ١ × ٠,٢ م٣ وتحت ميكروسكوب وبقوة تكبير × ٣٢٠ تعد البروتوزوا .

ثانيًا : بكتيريا الكرش :

١ ـ جمع العينة وتجهيزها : تجمع عينات الكرش عقب الوفاة مباشرة ، أو من فتحة مستديمة في كرش المجترات الحية . وللفحص الميكروسكوبي تثبت العينة بدون تأخير بواسطة فورمالين ١٠ ٪ أو محلول MFS كما في بروتوزوا الكرش .

٢ ـ العدّ الميكروسكوبي : تمسح شريحة زجاجية بمحلول مخفف (٠,٠١ مل)

١٠^٣–٥١٠ مرة من عينة محتويات الكرش . جفف الشريحة هوائيا ، وثبتها بالحرارة ، ثم اصبغها بصبغة جرام . عدّ على الأقل ١٠٠ خلية بكتيرية أو ١٠ حقول ميكروسكوبية ، واعتبر السلاسل أو الأزواج على أنها أفراد خلوية. احسب متوسط عدد البكتيريا في الحقل، احسب متوسط عدد البكتيريا في العينة / جم =

(متوسط العدد في الحقل) × (عدد الحقول/ سم^{٢} (٧,٠٩ × ١٠ ^{٣}) × (التخفيف (١٠)^{٣}) × (١٠ ^{٢}(٠,٠٠١ مل).

وتحضر صبغة جرام بإذابة ١٠ جم Crystal Violet في لتر ماء مقطر ، وإذابة ٥٠ جم بيكربونات صوديوم في لتر ماء ، وإذابة ٤ جم صودا كاوية في ٢٥ مل ماء و ٢٠ جم يود + ١ جم يوديد بوتاسيوم في ٩٧٥ مل ماء مقطر ، اخلط ٣٠٠ مل أسيتون مع ٧٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥٪ ، أذب ٢٠ جم سافرانين فى كحول إيثايل ٩٥ ٪ وأكمل إلى لتر بالماء المقطر ، وهكذا تنتج صبغة جرام من هذه المحاليل مجتمعة طبقا لتطوير Kopeloff .

ويمكن الرجوع إلى المرجع :

- Ogimoto , K .& Imai , S. (1981) Atlas of Rumen Microbiology . Japan Scientific Societies Press , Tokyo .

الفصل الثالث

استخدام ميكروفلورا الكرش في تقييم مواد العلف

يستخدم في التقديرات المعملية لتجارب الهضم In vitro Rumen أو الكرش الصناعي لتقدير العديد من العينات العلفية من حيث معاملات هضمها ، وإنتاجها للأحماض الدهنية ، وفيها يؤخذ دورق طويل العنق سعة ٥٠٠ مل (أو أنبوبة سعة ٥٠ مل) يوضع بها ٦ مجم عينة جافة + ١٦٠ مل ماء + ١٥٠ مل سائل كرش + ٥٠ مل لعاب صناعي على أن تجهز الدوارق قبل استحضار سائل الكرش ، حيث يستحضر سائل الكرش في ترمس تحت تيار (ك أ٢) بسرعة ، ويرشح على شاش قبل وضعه في الترمس ، وينقل بسرعة للمعمل لإضافته على الدوارق (الكروش الصناعية) ، حيث تعمل ٣ دوارق لكل عينة ، علاوة على دوارق لعينة مختبرة ومعلومة ، ودوارق بدون عينات كبلانك ، وتزود الدوارق بغاز (ك أ٢)، وتحفظ في حمام مائي على ٣٩ ± ١°م في ظلام مع الرج كل ٦ ساعات حتى ٤٨ ساعة ، بعدها يقدر في الكرش الصناعي الأحماض الدهنية (بالكروماتوجرافي الغازي) المخلقة من العينات المدروسة . وإذا استكمل هضم العينات الإنزيمي (ببسين ٢٤جم ١ :١٠,٠٠٠ في ١٢٠مل حمض هيدروكلوريك ١٠ عياري ويكمل إلى ١٢ لترًا) لمدة ٤٨ ساعة أخرى ، فإن المتبقي في الكرش الصناعي (بترشيحه على شاش) يماثل الخارج في روث الحيوان فتحليل العينة وتحليل ما تخلف في الكرش بعد الهضم باللعاب وسائل الكرش والحامض والببسين يمكن حساب معامل الهضم معمليا In Vitro Digestibility كالتالي :

٪ معامل هضم المادة الجافة = ١٠٠ [المادة الجافـة للعينة – (المادة الجافة المتبقية – (المادة الجافة للبلانك)] / المادة الجافة للعينة .

المادة العضوية المهضومة/١٠٠جم مادة جافة = ١٠٠ [المادة العضوية للعينة – (المادة العضوية المتبقية – المادة العضوية للبلانك)] / المادة الجافة للعينة .

٪ معامل هضم المادة العضوية = ١٠٠ [المادة العضوية للعينة – (المادة العضوية المتبقية – المادة العضوية للبلانك)] / المادة العضوية للعينة .

ويتكون اللعاب الصناعي من الأملاح والمعادن اللازمة لعمل الكائنات الحية الدقيقة في سائل الكرش ، وأبسط تركيب له من ٣٧ جم Na_2HPO_4 لامائي ، ٩٨جم $NaHCO_3$ تذاب في ١٠ لتر ماء مقطر على ٤٠°م. ومحلول آخر من ٤٧ جم NaCl، ٥٧ جم KCl ، ٤ جم

$CaCl_2$ ، ٦ جم $MgCL_2$ مذابة في لتر ماء . ويضاف ١٠٠ مل من المحلول الثاني إلى ١٠ لتر من المحلول الأول ويقلب كهربيا Electric Stirrer لمدة ربع ساعة تحت غاز (ك أ٢) .

الهضم المعملي بطريقة انتاج الغاز :

In Vitro Digestibility by gas Production System

تستخدم هذه الطريقة في تقدير معامل الهضم للمادة العضوية معمليا ، وكذلك المحتوى من الطاقة القابلة للتمثيل الغذائي في مادة علف معمليا للمجترات . وتعتمد هذه الطريقة على معدل إنتاج غازات الكرش (ك أ٢ ، ك يد٤) من تحضين مادة علف مع سائل الكرش معمليا ، إذ يختلف هذا المعدل باختلاف معاملات الهضم .

المحاليل :

١ ـ محلول (أ) معادن نادرة :

كلوريد كالسيوم ثنائي الماء	١٣,٢ جم
كلوريد منجنيز رباعي الماء	١٠,٠ جم
كلوريد كوبلت سداسي الماء	١,٠ جم
كلوريد حديديك سداسي الماء	٨,٠ جم
ماء مقطر حتى	١٠٠ مل

٢ ـ محلول (ب) منظم الكرش :

بيكربونات أمونيوم	٤,٠ جم
بيكربونات صوديوم	٣٥,٠ جم
ماء مقطر حتى	لتر

٣ ـ محلول (ج) معادن كبيرة :

فوسفات صوديوم أحادية الهيدروچين جافة	٥,٧ جم
فوسفات بوتاسيوم ثنائية الهيدروچين جافة	٦,٢ جم
كربونات ماغنسيوم سباعية الماء	٠,٦ جم
ماء مقطر حتى	لتر
٤ ـ محلول ريسازيورين Resazurine	٠,١ ٪

٥ ـ محلول اختزال :

هيدروكسيد صوديوم (١ ع)	٤ مل
كبريتيد صوديوم تساعي الماء	٦٢٥ مجم

ماء مقطر ٩٥ مل

٦ ـ نشا أذرة تجاري .

٧ ـ مسحوق دريس قياسي مضبوط لإنتاج ٤٤,١٦ مل غاز على ارتفاع ٤٠٠م فوق سطح البحر ، يحصل عليه من معهد تغذية الحيوان بجامعة هوهنهيم بمدينة شتوتجارت الألمانية (P. O. Box 700562, 7000 Stuttgart 70) .

٨ ـ سائل الكرش من حيوانات تأكل ٦٠٪ من العليقة أعلاف خشنة .

الأجهزة :

١ ـ أنابيب وخراطيم لجمع سائل الكرش ، شاش ، مصدر لغاز ثاني أوكسيد الكربون .

٢ ـ فرن كهربائي للتحضين مضبوط على ٣٩ ± ٠,٥°م مزود بمروحة ، ويتسع لبكرة بقطر ٥٠سم داخل الفرن الذي سعته في حدود ٢٤٠ لتراً .

٣ ـ بكرة الفرن من قرصين من الخزف أو الخشب قطر ٥٠سم وسمك ١,٥سم بينهما مسافة ١٢سم ، ومثقبان حوالي ٦٠ ثقباً سعة كل منها ٣,٨سم لحمل السرنجات .

٤ ـ موتور يحرك بكرة الفرن بمعدل ١-٢ لفة / دقيقة .

٥ ـ سرنجات زجاجية قطر كل منها من الخارج ٣,٦سم وطولها تقريباً ٢٠سم ذات حجم مدرج ١٠٠ مل ، تزود السرنجات بأطراف سيليكون وعلى هذه الخراطيم السيليكون كلبسات لحجز الغازات .

٦ ـ سرنجات أوتوماتيك ، ومقلب مغناطيسي ، وميزان .

خطوات التقدير :

١ ـ تطحن العينة لتمر من منخل سعة فتحاته ١ م ، وتؤخذ عينة جافة ٢٠٠ مجم في السرنجة الزجاج سعة ١٠٠ مل (من كل عينة يجرى تقدير ٣ مكررات لمدة يومين مختلفين على الأقل ، أي تكون أقل عدد من المكررات ٦ مكررات من كل عينة) ، وفي حالة انخفاض تركيز طاقة العلف تزاد العينة المأخوذة إلى ٥٠٠ مجم مادة جافة ، على ألا يزيد إنتاج الغاز عن ٩٠ مل .

٢ ـ تعد بيئة التحضين بأخذ ٤٠٠ مل ماء ثم ٠,١ مل محلول (أ) ثم ٢٠٠ مل محلول (ب) ثم ٢٠٠ مل محلول (ج) ثم ١,٠ مل محلول ريسازيورين ثم ٤٠ مل محلول اختزال (على الترتيب) ، وتحضر هذه البيئة مباشرة قبل جمع سائل الكرش ، ويحفظ تحت ثاني أكسيد الكربون في حمام مائي على ٣٩°م مع تقليبه بمقلب مغناطيسي .

٣ ـ يسحب سائل الكرش من الفتحة المستديمة المثبتة في كرش حيوان مجتر (بقرة ، عجل ، خراف) ، ويصفى خلال طبقتين من الشاش إلى دورق دافئ سعة ٢ لتر مليء

بثاني أكسيد الكربون ، على أن يتم جمع السائل قبل التغذية . يُخلط حجم من سائل الكرش مع حجمين من بيئة التحضين في دورق عليه مضخة أوتوماتيك وموضوع في حمام مائي على ٣٩ْم ويقلب مغناطيسيا . يسحب ٣٠ مل من مخلوط سائل الكرش وبيئة التحضين بواسطة المضخة الأوتوماتيك إلى كل سرنجة سبق تدفئتها على ٣٩ْم ، مع إزالة أي فقاعات غازية من السرنجة ، ويغلق الكلبس لسد الخرطوم السيليكون على طرف السرنجة ، ويقرأ الحجم المشغول من حيز السرنجة ويسجل ، ثم تحضن السرنجات في الحضان على أن تبدأ فترة التحضين في الصباح ليتم قراءة حجم الغاز بعد ٦–٨ ساعات من التحضين ، فإذا زادحجم الغاز والبيئة عن ٦٠ مل يفتح الكلبس ويطرد الغاز ويضغط المكبس إلى ٣٠ مل ، وتقرأ القراءة الأخيرة بعد مضي ٢٤ ساعة من التحضين . وتسجل كل القراءات بسرعة لتجنب التغيرات في درجة الحرارة .

٤ ـ يجرى نفس الخطوات لعمل عينات خاوية من العينة للمقارنة (سائل كرش + بيئة تحضين بدون عينات) (Gb_o) ، وكذلك تحضن ٢٠٠ مجم عينة من مسحوق الدريس القياسي التي تعطي ٤٤,١٦ مل غاز / ٢٤ ساعة (Gb_H) ، وتحضن كذلك عينة من الدريس القياسي (١٤٠ مجم مادة جافة) ونشا ذرة (٦٠ مجم مادة جافة) والتي يجب أن تعطى معدل إنتاج غاز ٥٩,٨ مل / ٢٤ ساعة (Gb_{Hs}) وذلك للتصحيح لمختلف مواد العلف المدروسة ، أي أن معامل التصحيح للدريس (F_H) عبارة عن ٤٤,١٦ / $Gb_H - Gb_O$ ومعامل التصحيح للمركزات (F_{H2}) عبارة عن ٥٩,٨ / $Gb_{H2} - Gb_O$ ويستخدم متوسط هذين المعاملين لتصحيح قياسات العينات . وفي حالة زيادة معامل تصحيح الدريس عن ١,١ فينبغي زيادة الأعلاف الخشنة للحيوان المأخوذ منه سائل الكرش ، بينما لو زاد معامل تصحيح المركزات عن ١,١ فينبغي زيادة المركزات و / أو مستوى التغذية .

٥ ـ حساب النتائج يتوقف على تصحيح لوزن العينة (Wt) المختلف عن ٢٠٠ مجم مادة جافة ولنشاط سائل الكرش . ويكون معدل إنتاج الغاز (Gb) عبارة عن إجمالي الزيادة في الحجم ($V_{24} - Vo$) مطروحاً منها إنتاج غاز المقارنة الخاوية (Gb_o) وتضرب في معامل تصحيح الوزن (٢٠٠ / الوزن) وفي متوسط معامل التصحيح F_H ، F_{Hs} .

$$Gb = (V_{24} - Vo - Gbo)\ \frac{200}{Wt} \cdot \frac{F_H + F_{HS}}{2}$$
$$= (V_{24} - Vo - Gbo)\frac{F_H + F_{HS}}{Wt} \cdot 100$$

ومنه تستنتج معامل هضم المادة العضوية (do%) على أساس إنتاج الغاز ، ومحتوى المادة من البروتين الخام (P × %) على أساس المادة الجافة :

$$do\ \% = 0.76\ Gb + 0.637\ \%\ P + 22.5$$

كذلك يقدر المحتوى من الطاقة المهضومة (DE) والقابلة للتمثيل الغذائي (ME)

بالميجاجول / كجم مادة جافة مـن إنتاج الغاز ، والمحتوى من البروتين (p %) ، الدهن (% × L) على النحو التالي :

$$DE = 0.1384\ Gb + 0.142\ \%\ x\ P + 0.111\ \%\ x\ L + 2.86$$

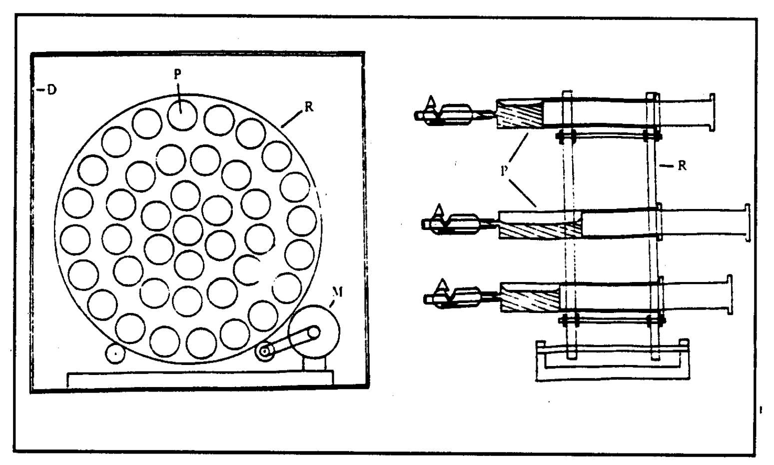
$$ME = 0.1456\ Gb + 0.0767\ \%\ x\ P + 0.164\ \%\ x\ L + 1.2$$

وبين هذه القيم المعملية (ME ، DE ، do) والنتائج البيولوجية على الأغنام في تجارب هضم عديدة بينها ارتباط شديد حوالي ٩٧٪ .

وبنفس الأسلوب تحسب الطاقة الصافية لإنتاج اللبن (NEL) :

$$NEL = 0.1010\ Gb + 0.0051\ x\ P + 0.011\ x\ L$$

$$= 0.24\ ME^2 / GE + 0.463$$



(شكل ٣٦)

قطـاع في حضان السـرنجات المستخـدم في تقـدير معامـل الهضم معملياً بإنتـاج الغاز يوضح السـرنجات (P) في البكرة الدوارة (R) بالموتور (M) في فرن تجفيف (D) على ٣٩ ± ٠,٥ م° .

ومن إنتـاج الغـاز يمكن الاستـدلال على أزوت الأمونيـا المتحـررة في الكرش الصناعي لوجود علاقة قوية بينهـما ، إذ تستغل الأمونيا جزئياً في تخليق البروتين الميكروبي ، وإنتاج الغازات (ثاني أوكسيد الكربون والميثان) فتعتبر مقيـاس لوفرة الطاقة لتخليق البروتين . فمن العلاقات الخطية لارتداد إنتاج الغاز على إنتاج الأمونيا يمكن حساب الأمونيا الناتجة

من العينة ، ويطرح منها الأمونيا الناتجة من مقارنة بدون عينة لحساب الأمونيا المتحررة من البروتين والمكونات الأزوتية الأخرى في مادة العلف المحضنة في الكرش الصناعي لحساب تكسير النيتروچين معملياً In Vitro - Degradable N (IVDN) من المعادلة :

النيتروچين المهضوم معمليا = (نيتروچين الأمونيا عند عدم توفر كربوهيدرات أي عند عدم تخليق بروتين ميكروبي . نيتروچين أمونيا المقارنة بدون عينة) / النيتروچين الكلي في العينة المحضنة .

علماً بأن التحضين معمليا يكون مع ٣٠ مل سائل كرش في سرنجات سعة ١٠٠ مل لمدة ٢٤ ساعة على ٣٩ ± ٠,٥°م في حضان يشتمل حامل (بكرة) سرنجات دوار .

كما يمكن من التحليل المعملي للمركبات الغذائية في أي مادة علف التنبؤ بمعاملات هضم والقيمة الغذائية لهذه المادة العلفية بموجب التطبيق في معادلات ارتداد خاصة للعلاقة بين التركيب الكيماوى ومعاملات الهضم ، أو التركيب الكيماوي والقيمة الغذائية دون إجراء دراسات مطولة لا على الحيوان ولا معمليا.

تقييم البروتين بالتحضين في كرش المجترات :

لقد طورت طريقة لتقييم مواد العلف بتحضينها In situ في الكرش الطبيعي لتقدير اختفاء Disappearance أو تكسير Degradability بروتين العلف .

وفيما يلي خطوات هذه الطريقة :

١ ـ استخدام أكياس من ألياف صناعية بولي استر Palyester ، وهذا النسيج قطر مسامه ٤٠ - ٥٠ ميكرون ، وفتحة الكيس حوالي ٢٦٪ من مساحة الكيس الذي أبعاده ١٠×٢١ سم ، وذو قاعدة مستديرة ، ويحاك بعدد غرز ١٠ غرز / سم (يمكن شراؤها جاهزة من Sericol Group LTD, Industrial Fabrics Division, 24 Parsons Green Lane, London SW6 4HT) مع سد ثقوب الحياكة بمادة أساسها السيليكون (مثل Hylosil) لمنع فقد العلف خلال هذه الثقوب ، والحياكة أيضاً بخيط صناعي بولي استر على أن تكون الحياكة غرزة رجل غراب . ويجب التأكد باستمرار من متانة الكيس وانسداد ثقوبه وإلا استبعدت الأكياس التالفة إن لم يمكن ترميمها بخيط بولي استر ومادة ملء الثقوب .

٢ ـ العينة تكون جافة هوائيا مطحونة لتمر من ثقوب منخل ٢,٥ م ، وتستبعد الجزيئات الناعمة بنخل العينة بمنخل ٤٥ ميكرومتر . العينات الغنية بالزيت صعبة التداول يتم طحنها مع ثلج جاف. الأعلاف الخشنة تطحن لتمر من منخل ٤ م ويستبعد كذلك الناعم منها . الأعلاف الخضراء تقطع يدويا لطول حوالي ١ سم في حالة طازجة أو مجمدة . الجذور الدرنية يؤخذ منها مكعبات ١ سم تقريباً . وفي كل الحالات يجب الحذر من فقد عصير العينات . يؤخذ في كل كيس حوالي ٥ جم مادة جافة بغض النظر عن نوع العلف .

٣ ـ تعتبر الماشية أفضل الحيوانات لتحضين الأكياس لاستيعابها كماً أكبر من العينات والأكياس كمكررات . وينبغي ذكر نوع الحيوان المستخدم كرشه في التحضين . كما ينبغي أن يتحصل الحيوان على احتياجاته الحافظة من الغذاء على أن تكون نسبة الأعلاف الخشنة إلى المركزات المكعبة ٤٠/٦٠ (مادة جافة) . كما ينبغي أن يحتوي بروتين العلف المركز على مصادر نباتية وأخرى حيوانية (لا تزيدعن٥ ٪ كبروتين حيواني) ، وأن يحتوي ١٧,٥ ٪ بروتين خام ، ٥-٨ ٪ ألياف ، ٤-٤,٥ ٪ زيت ، ٢٣-٢٨ ٪ نشا . وأن تكون الأعلاف الخشنة المقدمة في غذاء الحيوان متوسطة إلى جيدة الجودة من الدريس أو السيلاج . ينبغي تقديم غذاء الحيوان على مدار اليوم ، على الأقل على ٤ وجبات . وبالنسبة للبقر الحلاب يقدم له عليقة أعلاف خشنة / مركزات بنسبة ١/١ . وينبغي العلم بأن اختلاف نسبة الأعلاف الخشنة إلى المركزات يؤثر على نظام اختفاء النيتروچين من الأكياس الداكرون ، لذلك فأي تغييرات عن هذا النظام المقترح ينبغي ذكرها . وضع وإزالة الأكياس ينبغي أن يتم قبل التغذية .

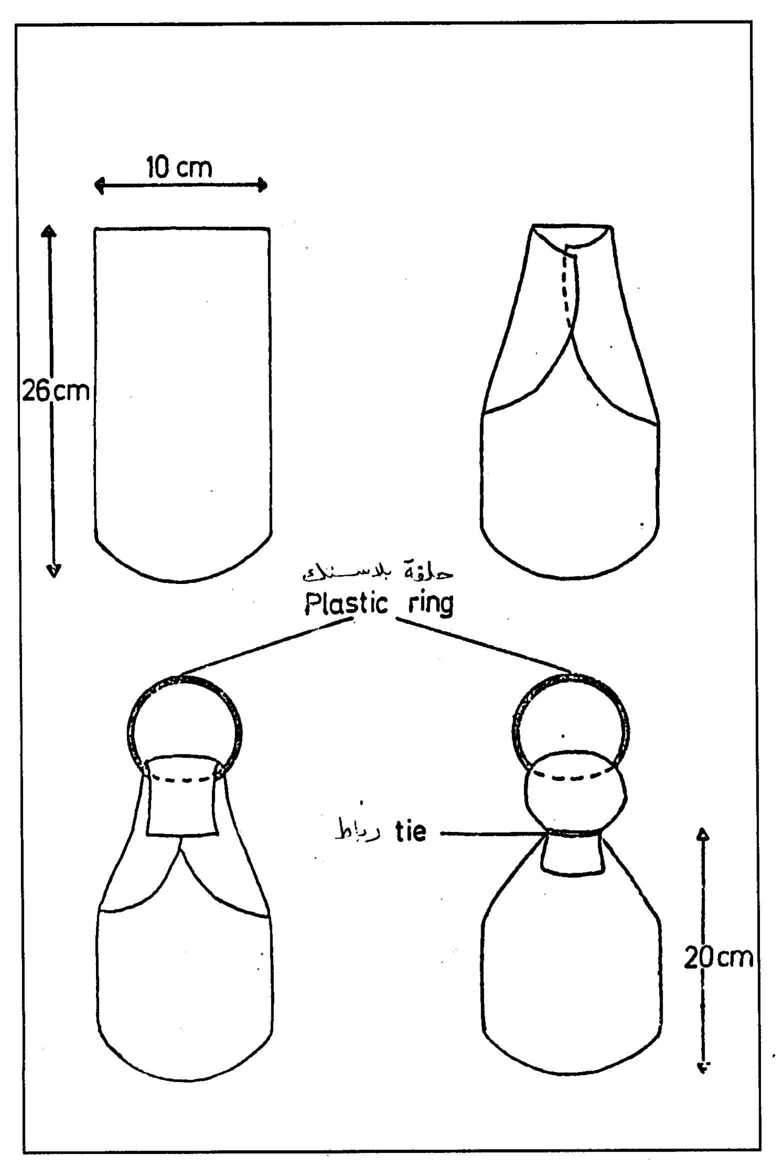
٤ ـ تحضن الأكياس في سائل الكرش بحيث يسمح بحرية حركتها (ما عدا الأكياس عند نقطة الصفر أو زمن الابتداء والتي تؤخذ وتغسل مباشرة دون تحضين) ، لمدد حتى ٧٢ ساعة للأعلاف الخشنة ، ٤٨ ساعة للمركزات ، أي أن فترات التحضين للمواد الخشنة تكون ٨ ، ١٢ ، ٢٤ ، ٤٨ ، ٧٢ ساعة ، بينما للمركزات ٢ ، ٦ ، ٨ ، ٢٤ ، ٤٨ ساعة . على أن يكون التحضين بمعدل كيس لكل فترة تحضين في ثلاث حيوانات أو أكثر ، أو في حيوانين على أن تعاد فترات التحضين مرة أخرى .

٥ ـ الأكياس عند زمن والابتداء والأكياس المستخرجة من الكرش بعد التحضين يتم غسيلها في ماكينة غسيل بماء بارد لمدة ٥٠ - ٦٠ دقيقة ، ثم تجفف في نفس الماكينة بلف حلتها ٥٠٠ - ٦٠٠ لفة / دقيقة .

إذا لم تتوفر ماكينة الغسيل ، فإنه يمكن غسيل الأكياس يدويا بماء جار حتى يصير الماء رائقاً . تحفظ الأكياس بالتجميد لحين تجميعها للغسيل معاً وبعد تجفيف الأكياس تحفظ في مجفف على خامس أكسيد الفوسفور أو سيليكاچيل لحين وزنها . وبعد الوزن يجب طحن العينة حتى التجانس للتحليل للنيتروچين .

٦ ـ يعبر عن النتيجة كنسبة مئوية للنيتروچين المفقود من الكيس في زمن التحضين

$$\text{٪ فقط للأزوت} = \left(١ - \frac{\text{النيتروچين المتبقي في الكيس}}{\text{النيتروچين الأصلي في الكيس قبل التحضين}}\right) \times ١٠٠ \ .$$



(شكل٣٧) أكياس بولي إستر تستخدم في تقدير معامل هضم الأعلاف بتحضينها في الكرش

هضم المادة الجافة في الكرش :

يقدر معدل اختفاء (هضم) المادة الجافة في الكرش باستخدام أكياس (١٩ × ٧سم) داكرون، على يومين ولفترات مختلفة ، فيوضع (يحضن) ٣ أكياس موزونة (لكل يوم) بكل منها كمية معلومة (حوالي ٥ جم) من المادة الجافة للعلف محل الدراسة ، وتعلق في سائل الكرش لحيوانين على الأقل ، بكل منها فتحة مستديمة في الكرش Cannula ، مباشرة قبل تقديم عليقة الصباح ، يزال كيس من كل حيوان كل يوم (من اليومين) بعد ٨ ، ١٦ ، ٢٤ ساعة . تغسل الأكياس وتجفف حتى ثبات الوزن على ١٠٠م ، ثم يوضع بها الوزن المعلوم من مادة العلف ، ويربط كل كيس بخيط نيلون ، ويثبت طرف الخيط الآخر بسدادة الفتحة المستديمة للكرش ، بحيث يكون طول الخيط ما بين سدادة الفتحة المستديمة وطرف الأكياس حوالي ٣٥سم . تنقع الأكياس في ماء لمدة دقيقة قبل تعليقها في الكرش .

بعد انتهاء فترات التحضين تزال الأكياس من الكرش ، وتُغسل تحت ماء صنبور جار حتى يزول لون ماء الغسيل ، ثم تجفف الأكياس حتى ثبات وزنها على ١٠٠م ، وتحسب عند ذلك نسبة المادة الجافة المختفية بالفرق بين الكمية المحضنة والكمية المتبقية في الكيس بعد التحضين .

ويمكن الرجوع للمراجع التالية لمزيد من الدراسة :

- Cottrill , B.r & Evans, P.J. (1984) ARC Technical Review (Wp/Ra 7/0178/SH) .
- De Boever, J.L. et al (1986 & 1988) Anim . FeeD Sci . Technol ., 14 : 203 & 19 : 247 .
- Dowman , M.G. & Collins , F.C. (1982) J . Sci. Food Agric., 33 : 689 .
- Mehrez , A.Z & Qrskov , E.R. (1977) J. Agric., Sci, Camb ., 88 : 645 .
- Menke , K.H. et al . (1979) J. Agric Sci , Camb ., 93 : 217 .
- Menke , K.H. & Steingass, H . (1987) Ubers. Tierernahrg ., 15: 59.
- Menke , K.H. & Steingass , H. (1988) Anim Res Develop., 28 : 7 .

- Minson , D.J. & Mc Leod , M.N . (1972) Technical Paper No . 8 Commonwealth Scientific & Industrial Research Organizatio Australia .
- Reab , L . (1979) Ubers. Tierernahrg .,7 : 162 .
- Reab, L . et al (1980) 31. Jahrestagung der Europaischen Vereni-gung Fur Tierzucht .
- Raab. L. et al . (1983) Br . J. Nut ., 50 : 569 .
- Steingass , H . & Menke, K.H. (1980) Kraftfutter , 63 :534.
- Steingass , H . & Menke , K.H. (1981) Anim . Res Develop.,15 :31.
- Steingass , H . & Menke , K.H. (1986) Ubers Tierernahrg ., 14 : 251 .

الباب الخامس
التحليل البيولوچي

الفصل الأول

الاختبارات البيولوچية Biological Testes

فقد يكون بمادة العلف مكون ضار أو سام أمكن التعرف عليه لكن بدون تأكيد ، فقد تتداخل بعض الشوائب بمادة العلف مع هذا المكون ، أو تضلل ظهوره ، أو تضخم من كميته ، أو قد تظهر الشوائب (حتى على أحدث الأجهزة المستخدمة) بدلاً من المكون المدروس وتعطي نتائج مضللة ، أي موجبة رغم أنها في الواقع سالبة ، وفي هذا الشأن لابد من تأكيد النتائج Results Confirmation بعمل مشتقات بتفاعل هذا المكون (لو وجد) مع كيماويات تضاف إليه في تفاعل معلوم ، ثم الكشف عن المشتقات الناتجة ، أو بالكشف عن المكون المراد فحصه بأكثر من طريقة معاً في آن واحد ، سواء طرق طبيعية كيماوية أو طبيعية كيماوية مع طرق بيولوچية . وقد يكون هذا المكون غير متعرف عليه ولم نصل بعد لطريقة لفصله أو تقديره والكشف عنه ؛ لذا تجرى عليه إحدى الاختبارات البيولوچية لتأكيد أثره السام أو الضار ، لو كان له مثل هذه الآثار .

ومن الاختبارات البيولوچية :

١ ـ اختبار الجلد :

يجرى عادة على الأرانب أو الجرذان بإذابة المركب أو المكون أو مستخلصه في مذيب معين مثل خلات الإيثايل النقية ، ويعرّض لجلد الأرنب المحلوق سطحياً ، أو يحقن تحت الجلد .

ومن مشاكل هذا الاختبار هو اختلاف حساسيته طبقاً لنقاوة المذيب ، وتداخل أثر المكونات الطبيعية للعينة والتي تنتقل مع المذيب عند استخلاص المكون المدروس وتؤدي لتأثير مضاد Antagonist للمركب المدروس .

٢ ـ اختبار جنين الدجاج :

في حالة اختبار مركب ما يجرى اختبار جنين الدجاج Chicken Embryo Test أو جنين البط ، وذلك على بيض مخصب من عشوش نظيفة بعد فحصه ضوئياً بمصباح فحص البيض Egg Candling Light قوه ٦٠ وات ، وذلك لاستبعاد البيض ذي الخلايا الهوائية التي

ليست في موضعها أو المهتزة ، وذي البقع الدموية أو المشروخ ، أو ذي القشرة المعيبة وغيره من الشذوذ . كما يوضع البيض في كراتين جديدتين ، ويكون البيض خالياً من Pullorum typhoid ، وسالباً لـ Mycoplasma gallisepticum ، وأن يكون وزن البيضة ما بين ٥٩-٦٧ جم ، وأن يكون الوقت بعد الوضع أقل من ٤٨ ساعة ، ويخزن على ٦٠°ف (١٥,٥°م) ، ورطوبة نسبية ٨٠٪ ، وأن تكون خصوبته أعلى من ٨٥٪ ، وأن يكون من قطيع غير معامل بالمضادات الحيوية أو مركبات زرنيخية أو نيتروفيورازونات .

بعد الفحص الضوئي للبيض يعلم على موضع الخلية الهوائية بقلم رصاص . يقسم البيض عشوائياً إلى مجاميع حسب العدد المطلوب لكل مستوى من العينات التي ستحقن . يرقم البيض كودياً للإشارة للتاريخ والمعاملات . استخدم قلماً رصاصاً صلباً نمرة ٣ لتفادي التلويث به عند استخدامه . يعمل ثقب بقطر ٥م في مركز الخلية الهوائية بحيث تخرج القشرة للخارج بواسطة ثاقب Drill البيض ذي قاطع نمرة ١٧٨ . أزل غشاء القشرة المرئي بملقط معقوف طول ١١٥م . باستخدام محقن ١-١٠٠ ميكرولتر وإبر منحنية (بطول ٢٥-٣٧م مقاس ٢٢-٢٧) تعمل بزاوية ٩٠° . وزع كمية العينة المطلوبة على غشاء البيض مع الحرص بألا تخترق الإبرة الغشاء . في الحال سد الثقب بقطعة من شريط السيلوفان اللاصق عرض ١,٢٥سم بحيث تغطي الثقب وأقل ما يمكن من باقي الخلية الهوائية . اترك البيض بدون إزعاج في وضع رأسي (الخلية الهوائية لأعلى) لمدة ساعة حتى تنتشر المادة . ضع البيض في مفرخة Incubator - Hatcher واضبط حرارتها ورطوبتها (٩٩,٧٥° ف أو ٣٧,٤°م ، ٦٠٪ رطوبة نسبية) . طهر المفرخة في الحال بالتدخين بعد ملئها بالبيض باستخدام مبخرة . التقليب آلى كل ساعتين أو يدوي على الأقل مرتين يومياً خلال ١٧ يوماً تحضيناً ويفحص ضوئياً في اليوم الرابع ثم يومياً بعد ذلك. يزال البيض الرائق والأجنة الميتة للفحص . سجل العمر ومظهر الجن كله لكل اختبار ومحلول مقارنة (كونترول) خلال فترة التحضين . في اليوم السابع عشر يوضع البيض في قسم الفقس ، حيث إن التقليب لم يعد هاماً أو مطلوباً ، وتضبط الحرارة والرطوبة النسبية المفضلة ودخن واترك البيض للفقس والجفاف (في اليوم ٢٢ أو ٢٣) . افتح وافحص كل البيض غير الفاقس وافحص الكتاكيت الفاقسة وسجل الملاحظات .

عادة يذاب المركب المدروس في مذيب كالكحول المطلق على أن تحقن الكونترول بالمذيب فقط ، ويجرى الاختبار على ١٠٠ بيضة عادة لكل تركيز على أوقات مختلفة،

أي تكرر ٤ مرات في كل مرة على ٢٥ بيضة / تركيز . ترسم منحنيات العلاقة مابين التركيز ولوغاريتم نسبة النفوق ٪ . وتقدر Lethal Dose (LD_{50}) أي الجرعة المميتة لنصف عدد البيض .

وعادة يجرى تقدير نسبتي الخصوبة والفقس بوضع حوالي ٣٠ بيضة بدون حقن مع كل تحليل . وهناك نظام متفق عليه للحقن من حيث الكميات كما يلي :

عدد البيض	الكمية المحقنة		٪ نفوق	المادة المحقنة
	ميكرولتر	ميكروجرام		
٢٠	٢٠	٠,٢٠٠	١٠٠	
٢٠	١٠	٠,١٠٠	١٠٠	المحلول مراد اختباره
٢٠	٥	٠,٠٥٠	٩٠	
٢٠	٢,٥	٠,٠٢٥	٥٠	
٢٠	٢٠	٠,٢٠٠	١٠٠	
٢٠	١٠	٠,١٠٠	١٠٠	محلول قياسي مشابه للمراد اختباره
٢٠	٥	٠,٠٥٠	٩٠	
٢٠	٢٠	—	٢٠	
٢٠	١٠	—	١٠	المذيب المستخدم
٢٠	٥	—	١٠	
٣٠	—	—	٢٠	كونترول غير محقون

ويتم تسجيل الشذوذ في الأجنة من حجم ووزن وقصر الأرجل والأوديما والنزف ، مع مقارنة البيض المحقون بالمحلول المراد اختباره بالبيض المحقون بمحلول قياسي Standard للمحلول المراد اختباره ، وفي الاختبار الموجب يلاحظ عدم الفقس بعد ٢٠ يوماً تحضيناً ، وفي الجرعات المناسبة يلاحظ عدم نمو الجنين بعد ٤ أيام . ولقد أعطى هذا الاختبار البيولوجي ارتباطاً ١٠٠ ٪ مع الاختبار الكيماوي في كثير من المركبات .

٣ ـ **تجرى الاختبارات البيولوجية** : تجرى هذه الاختبارات كذلك على يرقات سمك الحمار الوحشي Zebra Fish Larva ، أو خلايا الإنسان أو الحيوان ، أو الأميبا والحشرات والبكتيريا وغيرها كثيرا .

والأمثل هو الجمع بين طريقة بيولوچية مع أخرى كيماوية طبيعية . ولا غنى أساساً عن التحليل الطبيعي الكيماوي حيث إن الطرق البيولوچية أقل حساسية وأقل تخصصاً ، كما تحتاج وقتاً وجهداً ، فاختبار جنين الدجاج أو البط يحتاج عدداً كبيرا من البيض ، وفترة طويلة حتى يفقس البيض ، وخطوات عملية تستمر فترة التفريخ وحتى الفقس الذي يحتاج شهراً في البط ، بينما في اختبار الجلد Dermal Necrosis Test للجرذان أو الأرانب فإنه قد لا تظهر السمية الجلدية قبل عدة أيام ، بالإضافة للتداخلات الكثيرة للمذيب ولمكونات المستخلص الأخرى وللاختلافات الفردية .

وليس نفياً لما سبق ذكره من أن الطرق البيولوچية أقل حساسية وأقل تخصصاً عن الطرق الطبيعية الكيماوية ، فإن الطرق البيولوچية يؤكد الكل عدم تخصصها ، لكن يثبت البعض حساسيتها الكبيرة خاصة لمركبات سامة بعينها أو سامة خلوياً Cytotoxic ، فقد استخدم زهور نبات الدخان واستخلص منها حبوب اللقاح ، وأضيفت تركيزات مختلفة من السموم الفطرية المحتوية على مجموعة 12, 13- Epoxytrichothecene (وهما التوكسينان T_2 ، Diacetoxyscirpenol) إلى معلق حبوب اللقاح وتم تسجيل النسبة المئوية لتثبيط إنبات حبوب اللقاح بتأثير التوكسينات فوجد أن هذا الاختبار حساس جداً لجرعة بلغت ١ ٪ من الجرعة المميتة لنصف أجنة البيض في اختبار جنين الدجاج المعاملة بالتوكسين Ver-rucarin ، كما كان حساساً لدقة ١ نانوجرام من كل من التوكسينين المذكورين سابقاً ، بينما لم يعط أي حساسية للأفلاتوكسينات أو الأكراتوكسينات أو الإستريجما توسيستين . وهذا الاختبار الأخير يوضح أهمية وبساطة بعض الاختبارات البيولوچية الذى من السهل إجراؤها في المعمل دون تعقيدات وهي مكملة للاختبارات الكيماوية .

وقد استخدمت خلايا طلائية الإنسان كذلك لدراسة السمية الخلوية لعدد ٣٣سم فطري لمقارنة دقة الاختبار الخلوي بالتقدير الكروماتوجرافي رقيق الطبقات ، وثبت وجود اختلافات في مستويات اكتشاف هذه السموم ، وقد كان اختبار السمية الخلوية Cytotoxicity test أكثر حساسية بشكل معنوي عن الكروماتوجرافي رقيق الطبقات خاصة للتريكوثيسينات وأوصى باستخدامه في غربلة مستخلصات الأعلاف الحيوانية للبحث عن سموم فطرية غير معروفة .

المراجع :

- AOAC (1965) Association Of Official Agricaultural Chemists , 10 th Ed . , Washington .

- Robb , J. & Norval , M. (1983) Appl . Environ . Microbiol ., 46 : 948 .

- Siriwardana, T.M.G. &Lafont, P. (1978) Appl . Environ Microbiol., 35 : 206 .

الفصل الثاني

التجارب الحيوانية

قوم كثير من عمليات التقييم حيوياً على حيوانات المعمل المختلفة ، أو الحيوانات التجريبية كالقوارض من فئران ، جرذان ، الأرانب ، خنازير غينيا ، قطط ، كلاب ، وغيرها كثير. وهذه التجارب وكذا مجرد حيازة هذه الحيوانات تتطلب تصاريح من جهات معينة في بعض البلدان ، لكن حتى في الدول التي لا تضع قوانين لهذه التجارب وحيازة مثل هذه الحيوانات فإنه ينبغي توفير ظروف مناسبة لحياة الحيوان وإجراء التجارب ، بما فيها بيوت الحيوانات وشروطها من حيث المساحة والتدفئة والتهوية والتحكم في حرارة ورطوبة هذه البيوت ، وكذا يتطلب خبرة القائم على رعاية هذه الحيوانات من حيث الإمساك بالحيوان وتجنيسه والتعرف عليه ووقايته وعلاجه وتغذيته وتكاثره ونقله والأمراض التي قد تصيبه وكذا الحشرات والطفيليات ، كذلك يجب الإحاطة بطريقة تخديره وقتله وجراحاته وغير ذلك من متطلبات البحث في مثل هذه التجارب على الحيوانات .

فأحجام صناديق إيواء بعض الحيوانات يوضحها الجدول التالي :

نوع الحيوان	عدد الحيوانات	مساحة الأرضية م٢	حجم الصندوق م٣
قط	أنثى وخلفتها	٠,٥٤	٠,٢٤
خنزير غينيا	أنثى وخلفتها	٠,٠٩	متباين
فأر	تربية	٠,٠٤	٠,٠٠٦
أرنب	أنثى وخلفتها	٠,٥٤	٠,٢٤
جرذ	أنثى وخلفتها	٠,٠٤	٠,٠٢٦

وهذه الصناديق قد تكون من الصاج أو الألومونيوم (رقيق يتلف بسرعة خاصة في وجود قلوي) أو الصلب الذي لايصدأ أو الخشب أو الفيبرجلاس ، وقد تكون على أرضيات أو على أرفف أو على حوامل بعجلات متحركة ، في طبقة أو عدة طبقات تعلو بعضها كما في البطاريات . وتمد هذه الصناديق بأرضيات تسمح بالتخلص (أو جمع) مخلفات الحيوان، غذايات، مساقي بما يتناسب مع حجم الحيوان ، وقد تكون هذه الوسائل يدوية أو أوتوماتيكية الأداء . وللتعرف على الحيوانات يتم ترقيمها باستخدام الصبغات على الظهر ، أو أرقام الأذن أو الساق أو الجناح ، أو الوشم للأذن أو الصدر (للنسناس) ، أو

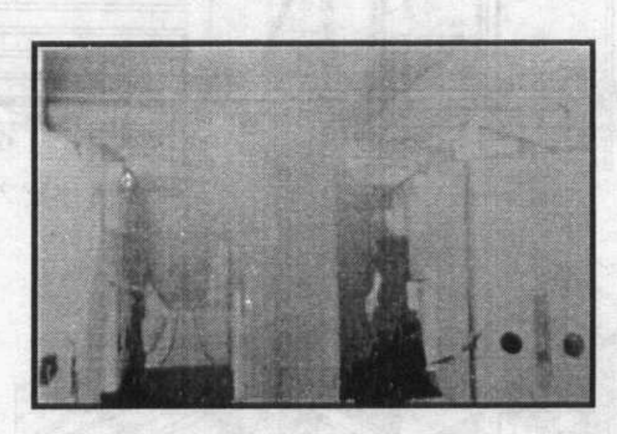
سلسلة حول الرقبة (قطط ، كلاب ، ماعز ، قردة) .

ويتم عمل فرشة للحيوانات ينبغي ألا تكون ضارة للحيوان وغير مأكولة وخالية من الطفيليات ومسببات الأمراض ، تعمل على امتصاص الماء ، قابلة للتغيير ، متوفرة وسهلة التخزين ورخيصة نسبياً . وعادة تكون من مخلفات مناشير الخشب أو النشارة أو القش وغيرها .

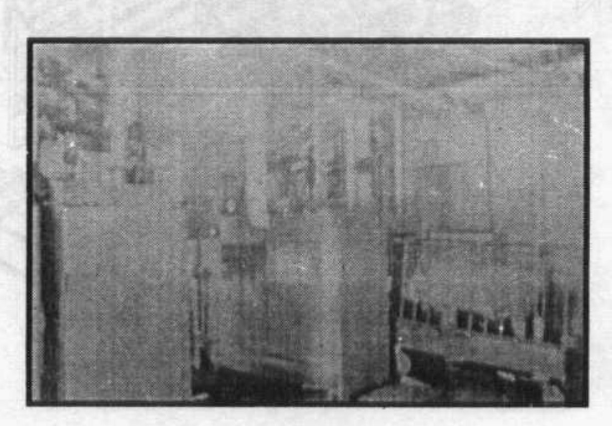
قدرة امتصاص المواد المختلفة للماء (كجم / كجم) والمستخدمة كفرشة :

المادة	كجم / كجم
الخشب :	
لحاء	٤,٠
لحاء ناعم جاف	٢,٥
قطع خشب صنوبر	٣,٠
نشارة صنوبر	٢,٥
مساحة صنوبر	٢,٠
إبر الصنوبر	١,٠
قطع ونشارة ومساحة الزان	١,٥
أذرة :	
قطع حطب	٢,٥
قوالح مطحونة	٢,١
قش :	
كتان	٢,٦
شوفان : دق	٢,٨
مخلوط	٢,٥
مقطع	٢,٤
قمح : مخلوط	٢,٢
مقطع	٢,١
دريس : مقطع ناضج	٣,٠
قشور الفول السوداني :	
وبذور القطن	٢,٥
والشوفان	٢,٠

بينما الأسماك يتم إيواؤها في أحواض من الزجاج أو الفيبرجلاس وخلافها ، بحيث لاتنفذ الماء ولا تكون سامة للأسماك وتغطى الأحواض لمنع بخر الماء ولتقليل التغييرات الحرارية والحماية من الأتربة ولمنع قفز السمك من الأحواض . وتحتاج الأسماك إلى إضاءة ١٢-١٥ ساعة يومياً ، وتهوية الماء باستمرار وتنقيته .

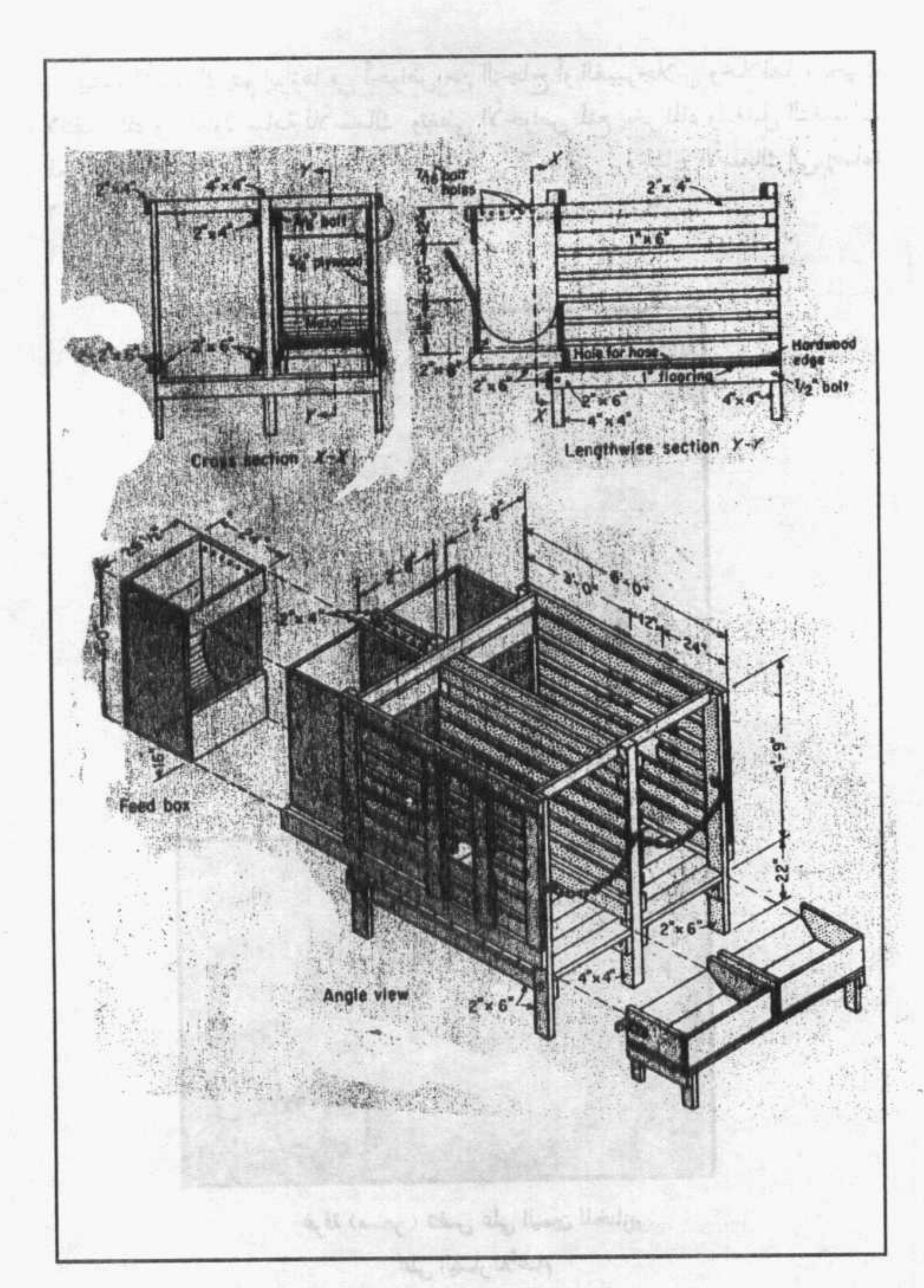


غرفة (مسعر) تنفس للماشية (مزدوجة)



غرفة (مسعر) تنفس على اليمين للخنازير
على اليسار للأغنام

(شكل ٣٨)



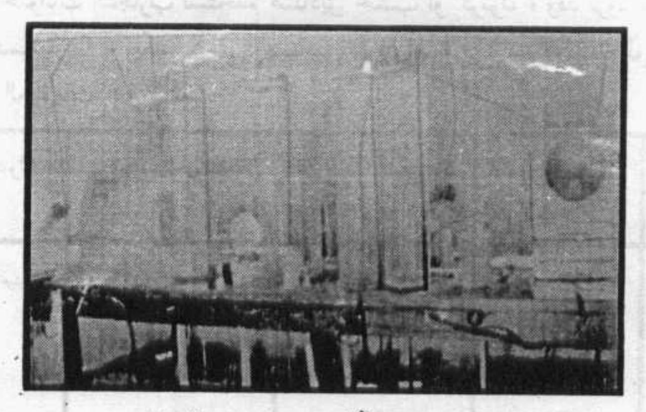
(شكل ٣٩) حظيرة هضم وميتابوليزم

ولنقل حيوانات التجارب تستخدم صناديق خشب أو كرتون ، وقد تزود بشباك (كما في نقل النسانيس) ، ويكتب على الصناديق محتواها من الحيوانات وخطورتها . وفيما يلي كثافة الحيوانات عند النقل :

نوع الحيوان	وزن الحيوان	أقصى عدد للحيوانات في الصندوق	المساحة المخصصة لكل حيوان سم٢	ارتفاع الصندوق سم
خنازير غينيا	١٧٠ - ٢٨٠ جم	١٢	٩٠	١٥
	٢٨٠ - ٤٢٠ جم	١٢	١٦٠	١٥
	أكبر من ٤٢٠ جم	١٢	٢٣٠	١٥
هامستر	صغير	١٢	٣٢	١٣
فأر	١٥ - ٢٠ جم	٢٥	٢٠	١٣
	٢٠ - ٣٥ جم	٢٥	٢٦	١٣
أرنب	أقل من ٢,٥ كجم	٤	٧٧٠	٢٠
	٢,٥ كجم	٢	١١٠٠	٢٥
	أكبر من ٥ كجم	١	١٤٠٠	٣٠
جرذ	٣٥ - ٥٠ جم	٢٥	٤٠	١٣
	٥٠ - ١٥٠ جم	٢٥	٥٢	١٣
	بالغ	١٢	١٠٠	١٣

وبعد استقبال الحيوانات لا ينبغي زحامها ، فلكي تكون في أمان يسترشد بالكثافة التالية للإسكان :

نوع الحيوان	العدد المفضل تسكينه معاً
فئران	١٥ - ٢٠
جرذ	٦ - ١٠
أرانب	مفرد
قطط	مفرد
نسانيس	مفرد
كلاب	مفرد



جهاز مسعر تنفس للأرانب نموذج ذو نظام مفتوح

يستخدم كثير من الحيوانات التجريبية في بيت الحيوان أو المعمل لتقييم مادة علف أو عقار ، أو معرفة الآثار المختلفة لمركب أو إضافة غذائية ، أو لدراسة مركب سام تم اكتشافه إلى غير ذلك من استخدامات حيوانات التجارب الغذائية والصيدلانية والجراحية وفي علم السموم وغيرها كثير .

وهذا يستلزم إيواء الحيوانات وتغذيتها ؛ ولذا نعرض للجانب الغذائي لبعض هذه الحيوانات .

أولا : الكلاب Dogs :

تحتاج الكلاب إلى طاقة في العليقة تبلغ ٥٠٠ - ٦٠٠ كيلو جول طاقة مهضومة / كجم حيز جسم تمثيلي (وزن الجسم)^{٠,٧٥} / يوم وذلك كاحتياجات حافظة ، ومنها استنتجت القيم التالية :

وزن الجسم كجم	حيز جسم تمثيلي كجم	احتياجات الطاقة المهضومة الحافظة بالكيلو جول / يوم	
		لكل كجم وزن جسم	لكل حيوان
٢	١,٦٨	٤٢٠ - ٥٠٠	٨٤٠ - ١٠٠٠
٥	٣,٣٤	٣٣٠ - ٤٠٠	١٦٥٠ - ٢٠٠٠
١٠	٥,٦٢	٢٨٠ - ٣٤٠	٢٨٠٠ - ٣٤٠٠
٢٠	٩,٤٦	٢٤٠ - ٢٨٠	٤٨٠٠ - ٥٦٠٠
٣٠	١٢,٨٠	٢١٠ - ٢٦٠	٦٣٠٠ - ٧٨٠٠
٤٠	١٥,٩٠	٢٠٠ - ٢٤٠	٨٠٠٠ - ٩٦٠٠
٦٠	٢١,٥٦	١٨٠ - ٢٢٠	١٠٨٠٠ - ١٣٢٠٠
٨٠	٢٦,٧٥	١٦٠ - ٢٠٠	١٢٨٠٠ - ١٦٠٠٠

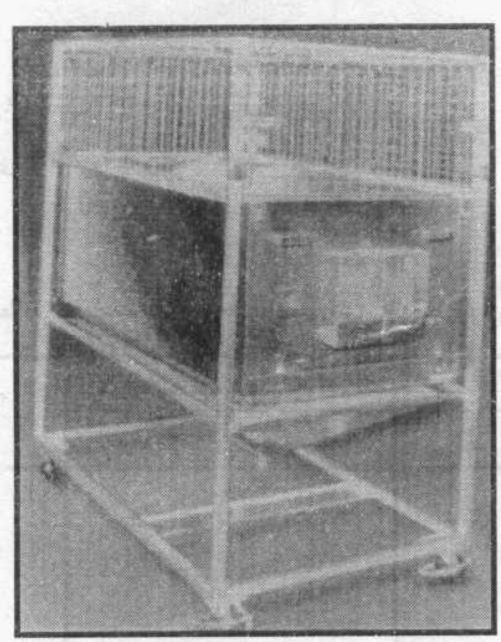
بينما احتياجات الطاقة المهضومة لإنتاج العمل (سير أو جري أو سبق) تبلغ ٦,٧ كيلو جول / كجم وزن جسم / كم للسلالات الخفيفة أو ٤,٢ كيلو جول / كجم وزن جسم / كم للسلالات الثقيلة من الكلاب .

وقدرت الاحتياجات الحافظة من الطاقة المهضومة (بالكيلو جول / كجم وزن جسم / يوم) اللازمة لنمو الكلاب طبقاً لوزن الجسم البالغ والعمر على النحو التالي :

وزن الجسم للكلاب تامة النمو كجم	١	٢	٣	٤	٥ + ٦	٧ وحتى تمام النمو
٥	٩٤٠	٩٥٤	٨٨٣	٧٦٦	٥٩٠	٤٥٢
١٠	٨٨٣	٩٠٨	٨٥٠	٦٧٣	٥١٥	٣٨٩
٢٠	٨٥٤	٨٦٦	٧٥٠	٥٩٤	٤٤٨	٣٤٧
٣٥	٨٢٩	٨٧٥	٧٤٥	٦٣٦	٤٦٥	٣١٨
٦٠	٧٩٥	٨٠٨	٧٧٥	٦٧٠	٤٦٧	٢٩٣

وبالنسبة للتناسل تتطلب الكلاب الحامل بداية من الأسبوع الرابع من الحمل مقررات من الطاقة المهضومة تبلغ احتياجات الحفظ علاوة على ١٦٠ كيلو چول / كجم وزن الجسم / يوم أو المقررات الكلية التالية :

وزن الجسم كجم	احتياجات الطاقة المهضومة بالكيلو چول / يوم ولكل	
	كجم وزن جسم	حيوان
٥	٥٦٠	٢٨٠٠
١٠	٤٩٧	٤٩٧٠
٢٠	٤٤٤	٨٨٨٠
٣٥	٤٠٧	١٤٢٤٥
٦٠	٣٧٦	٢٢٥٦٠



(شكل ٤٠) صندوق ميتابوليزم للجمع الفردي للروث والبول من الكلاب



(شكل ٤١) وحدة تربية خنازير غينيا ذات أرضيات سلكية طول ١١٥سم وعمق ٥٣سم وارتفاع٢٧سم

بينما لإنتاج اللبن من الكلاب (كميته ٤٪ من وزن الجسم ويحتوي ٥٧٠٠ كيلو چول/كجم لبن) تتطلب الإناث في حالة رضاعتها :

جرو واحد إلى ١,٥ مرة قدر الاحتياجات الحافظة.

٤ جراء مرتان قدر الاحتياجات الحافظة

٨ جراء ٣ مرات قدر الاحتياجات الحافظة

وذلك من الطاقة المهضومة ، وقد أوصى بالمقررات التالية طبقاً لوزن الجسم تام النمو :

وزن الجسم كجم	احتياجات إنتاج اللبن كطاقة مهضومة بالكيلو چول / يوم ولكل	
	كجم وزن جسم	حيوان
٥	٧٨٠	٣٩٠٠
١٠	٧١٧	٧١٧٠
٢٠	٦٦٤	١٣٢٧٠
٣٥	٦٢٧	٢١٩٤٥
٦٠	٥٩٦	٣٥٧٦٠

ومن العناصر الغذائية التي تتطلبها الكلاب في علائقها البروتين الذي تبلغ الاحتياجات إليه بمعدل ١٦٠ مجم أزوت / كجم حيز جسم تمثيلي / يوم كاحتياجات حافظة . ومن ذلك يوصي بالمقررات التالية من البروتين الخام المهضوم بالجرام / يوم كاحتياجات حافظة:

وزن الجسم كجم	لكل كجم وزن جسم		لكل حيوان	
	حد أدنى	حد مثالي	حد أدنى	حد مثالي
٢	١,٢٠	٣,٧٠	٢,٤٠	٧,٣
٥	٠,٩٥	٣,٠٦	٤,٧٧	١٥,٠
١٠	٠,٨٠	٢,٥٠	٨,٠٣	٢٥,٠
٢٠	٠,٦٨	٢٠٠	١٣,٥١	٤٠,٠
٣٠	٠,٦١	١,٨٥	١٨,٢٩	٥٥,٠
٤٠	٠,٥٧	١,٧٥	٢٢,٧١	٧٠,٠
٦٠	٠,٤٩	١,٥٠	٢٩,٣٧	٩٠,٠
٨٠	٠,٤٨	١,٤٤	٣٨,٢١	١١٥,٠

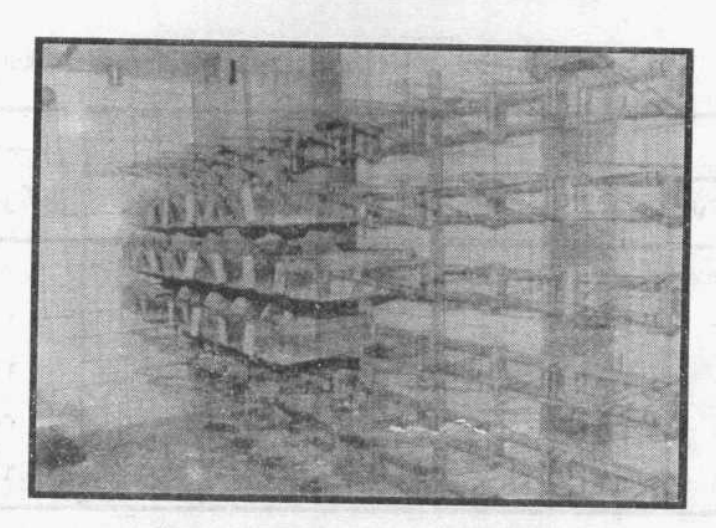
بينما احتياجات العمل كنسبة البروتين الخام المهضوم / الطاقة المهضومة فهي ذاتها الموصي بها في العليقة الحافظة . بينما للنمو يوصي بتوفير احتياجات البروتين الخام

المهضوم التالية (جم / كجم وزن جسم / يوم) :

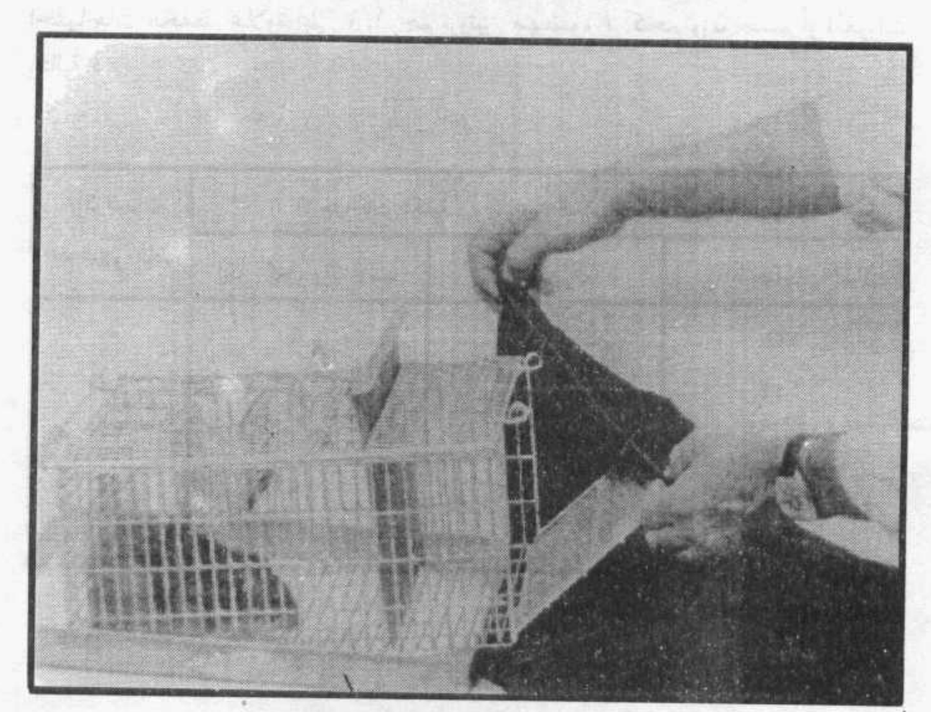
وزن الجسم تام النمو كجم	العمـر بالشهـر					
	١	٢	٣	٤	٥ + ٦	٧ - ١٢
٥	١٠,٠	٧,٦	٧,٢	٦,٢	٤,٩	٣,٧
١٠	٩,٤	٩,٢	٧,٦	٥,٥	٤,٣	٣,٣
٢٠	٩,٦	٨,٦	٦,٨	٤,٩	٣,٨	٣,٠
٣٥	٩,٥	٨,٥	٦,٩	٥,٦	٤,١	٢,٧
٦٠	٩,١	٨,١	٧,٥	٦,١	٤,٣	٢,٦

وللتكاثر ـ أي أثناء الحمل وبداية من الأسبوع الرابع من الحمل ـ تتناول الإناث احتياجات الحفظ علاوة على ١,١ جم بروتين مهضوم / كجم وزن جسم أو المقررات التالية :

وزن الجسم تام النمو كجم	الاحتياجات الكلية من البروتين الخام المهضوم (جم / يوم)		
	لكل كجم وزن جسم	لكل حيوان	٪ من الاحتياجات الحافظة
٥	٤,١	٢٠,٥	١٣٧
١٠	٣,٦	٣٦,٠	١٤٤
٢٠	٣,١	٦٢,٠	١٥٥
٣٥	٢,٩	١٠٠,٥	١٦١
٦٠	٢,٦	١٥٦,٠	١٧٣



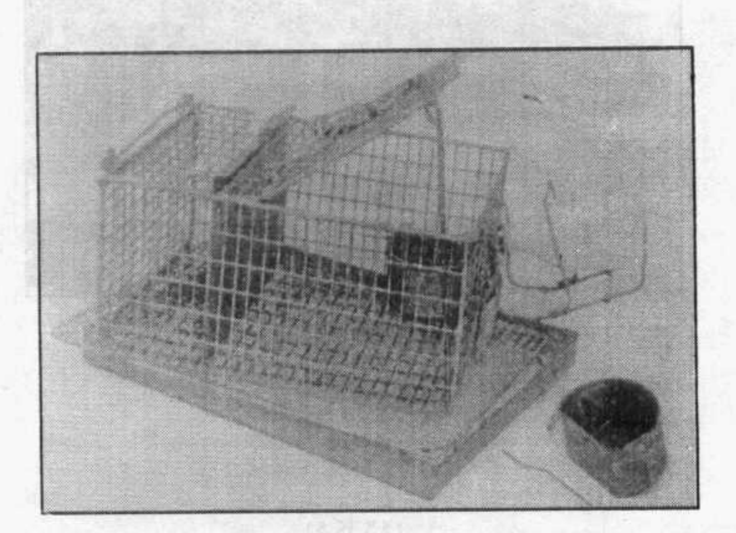
(شكل ٤٢) أقفاص متحركة على حوامل حائطية



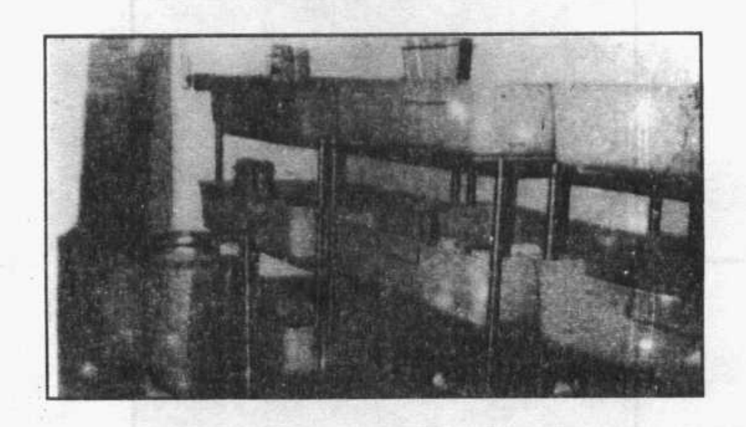
(شكل ٤٣) إخراج الجرذان البرية من القفص



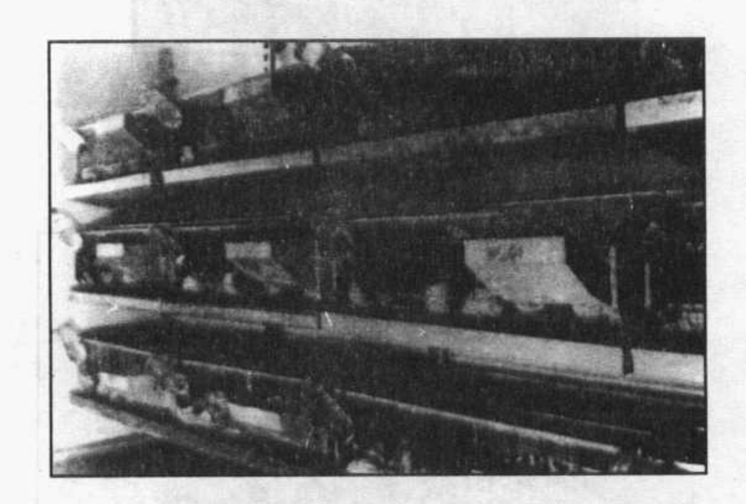
(شكل٤٤) أرفف متحركة بأقفاصها



(شكل ٤٥) قفص تجارب للجرذان البرية



صناديق فيبرجلاس لصغار حيوانات التجارب
(مثل خنازير غينيا)



بطاريات لحيوانات التجارب كالكلاب والقطط
والأرانب وخنازير غينيا

(شكل٤٦)

ولإنتاج اللبن من الكلاب يتطلب عليقة تحتوي من البروتين الخام المهضوم (جم / يوم) .

وزن الجسم تام النمو كجم	احتياجات حافظة لكل حيوان	احتياجات إنتاج اللبن / حيوان	احتياجات كلية لكل	
			كجم وزن الجسم	حيوان
٥	١٥	٢١,٤	٧,٢٨	٤٠
١٠	٢٥	٤٢,٩	٦,٧٩	٧٠
٢٠	٤٠	٨٦,٠	٦,٣٠	١٣٠
٣٥	٦٢	١٥٠,٠	٦,٠٣	٢١٥
٦٠	٩٠	٢٥٧,٠	٥,٧٨	٣٥٠

كما يوصي باحتواء عليقة الكلاب على ١ ٪ (من المادة الجافة) حمض لينوليك وعلى المقررات المعدنية والڤيتامينية التالية :

العنصر	كلاب تامة النمو	كلاب نامية
عناصر معدنية كبرى مجم/كجم وزن جسم/يوم		
كالسيوم	١٠٠	١٧٥ - ٤٦٠
فوسفور	٨٥	١٢٠ - ٢٩٠
بوتاسيوم	٢٥ - ٥٠	١٠٠
صوديوم	٨٠	١٥٠
ماغنسيوم	١٠	٢٠
عناصر نادرة مجم/كجم وزن جسم/يوم		
حديد	١,٢٠	١,٥ - ٣
نحاس	٠,٢٠	٠,٤
منجنيز	٠,١٠	٠,٢
زنك	١,٠٠	٢ - ٣
يود	٠,٠١	٠,٠٢

العنصر	كلاب تامة النمو	كلاب نامية
فيتامينات وحدة دولية أو ميكرجرام/كجم وزن جسم / يوم		
أ	١٠٠	٢٠٠ – ٣٠٠
د	١٠	٢٠
هـ	٢	٢ – ٤
ب١	٢٠	٣٠
ب٢	٤٠	٨٠
ب٦	٣٠	٦٠
ب١٢	٠,٥	١
بيوتين	٢	٤
حمض فوليك	٤	٨
نياسين	٢٠٠	٣٠٠
حمض بانتوثينيك	٢٠٠	٤٠٠
كولين	٢٥ ٠٠٠	٥٠ ٠٠٠

ونفس هذه المقررات المعدنية والفيتامينية تصلح كذلك للكلاب أثناء الحمل والرضاعة .
وعلى ذلك فالعلف المقدم للكلاب ينبغي أن يحتوي التركيزات التالية :

المغذيات	كلاب تامة النمو	كلاب نامية
طاقة مهضومة بالميجاجول / كجم	١٣ – ١٥	١٥ – ١٧
بروتين خام ٪ على الأقل	١٧	٢٥
بروتين مهضوم ٪ على الأقل	١٥	٢٢
دهـن خـام ٪ على الأقل	٥	٥
حمض لينوليك ٪ على الأقل	١	١
كالسيوم ٪	٠,٦	١,٠
فوسفور ٪	٠,٥	٠,٨
صوديوم ٪	٠,٤	٠,٥
فيتامين (أ) وحدة دولية / كجم	٥٠٠٠	٧٥٠٠
فيتامين (د) وحدة دولية / كجم	٥٠٠	٧٥٠

ويبلغ استهلاك العلف للكلاب حتى ٢ ٪ من الوزن الحي كمادة جافة في العلف .

ثانيا : القطط Cats :

تحتاج إلى علائق بها متطلباتها من الطاقة المهضومة (كيلو چول / كجم وزن جسم) التالية :

قطط نامية	قطط تامة النمو
حديثة الولادة ١٦٥٠	غير نشطة ١٧٥ – ٢٢٠
عمر ١٠ أسابيع ١٠٥٠	نشطة حتى ٣٥٠
عمر ٢٠ أسبوعا ٥٥٠	حامل ٤٢٥
عمر ٣٠ أسبوعا ٤٢٥	مرضعة ١١٠٠
عمر ٤٠ أسبوعا ٣٥٠	

بينما احتياجاتها من البروتين الخام (٪ من المادة الجافة للعلف) كالتالي :

الحالة الفسيولوچية	احتياجات البروتين الخام	
	حد أدنى	حد مثالي
قطط نامية	٣٣	٤٠
قطط تامة النمو	٢١	٢٦

ويعتبر التاورين Taurin أساسياً للقطط ، وهو موجود فقط في المواد الحيوانية كاللحوم والكبد .

ويعتبر حمض الأراشيدونيك أساسياً كذلك للقطط ، وهو موجود في الدهون الحيوانية .

أما احتياجات القطط المعدنية والڤيتامينية (مجم أو وحدة دولية / حيوان / يوم) فيوصي بالكميات التالية في علائقها :

العناصر	الكميات
معادن كبيرة :	
كالسيوم	٢٠٠ – ٤٠٠
فوسفور	١٥٠ – ٤٠٠
بوتاسيوم	٨٠ – ٢٠٠
صوديوم	٢٥ – ٢٠٠
مغنسيوم	٨ – ١٠
معادن نادرة :	
حديد	٥,٠
نحاس	٠,٢
منجنيز	٠,٢
زنك	٠,٣ – ٦,٠(*)
يود	٠,١ – ٠,٢
ڤيتامينات :	
أ	١٠٠٠ – ٢٠٠٠
د	٥٠ – ١٠٠
هـ	٣ – ٦
ب ١	٠,٢٠ – ٠,٤٠
ب ٢	٠,١٥ – ٠,٢٠
ب ٦	٠,٢٠ – ٠,٣٠
نياسين	٢,٦ – ٤,٠
حمض بانتوثينيك	٠,٢٥ – ١,٠
بيوتين	٠,١
إينوسيتول	١٠
كولين	١٠٠

(*) في حالة زيادة محتوى العليقة من البروتين النباتي .

وعلى ذلك يوصي بأن تحتوي المادة الجافة لعليقة القطط على التركيزات التالية :

العناصر	تركيزاتها
طاقة مهضومة ميجاجول / كجم	١٥ – ١٨
بروتين خام ٪ على الأقل	٢٦ (٤٠)(*)
دهن خام ٪ على الأقل	٩
حمض لينوليك ٪ على الأقل	١
حمض أراشيدونيك ٪ على الأقل	٠,١
تاورين ٪ على الأقل	٠,١
كالسيوم ٪	١,٠
فوسفور ٪	٠,٨
صوديوم ٪	٠,٤
فيتامين (أ) وحدة دولية / كجم	١٠ ٠٠٠
فيتامين (د) وحدة دولية / كجم	١٠٠٠

للقطط النامية :

وتستهلك القطط العلف بكميات (٪ مادة علف جافة من الوزن الحي للقطط) متباينة حسب حالتها الفسيولوجية كالتالي :

قطط نامية		قطط تامة النمو	
عمر ١٠ أسابيع	٦,٣	غير نشطة	١,٨
عمر ٢٠ أسبوعاً	٣,٢	نشطة	٢,٢
عمر ٣٠ أسبوعاً	٢,٥	حامل	٢,٥
عمر ٤٠ أسبوعاً	٢,٠	مرضعة	٦,٣

التحليل الكيماوي (٪ على أساس المادة الطازجة أو الأصلية) لبعض أعلاف آكلات اللحوم (كلاب ، قطط) :

مادة العلف	مادة جافة	بروتين خام	دهن خام	طاقة مهضومة* كيلو جول/١٠٠جم	كالسيوم
أرز مبيض	٨٩	٧,٢	٠,٣	١٤٣٤	٠,٠٠٦
بطاطس مطبوخة	٢٢	٢,١	٠,١	٣٢٨	٠,٠١٩
بالبخار	٨٩	٥١,٠	٠,٨	١٤٣١	٠,٢٨٦
كسب صويا	٩٤	١٦,٠	٢,٥	٧٠٥	١,٨٣٠
مستخلص	٩٤	٦٦,٦	١٨,٣	١٨٨٨	٨,٤٦٠
مسحوق برسيم حجازي	٤٢	١٨,٠	٢٢,٠	١٢٦٩	٠,٠١٠
مسحوق جثث	٥١	١٢,٠	٣٧,٠	١٦٩٦	٠,٠٠٩
لحم بقري (ضلوع)	٢٦	١٩,٠	٤,٥	٦٣٣	٠,٠١٣
لحم غنم (صدر)	٢٨	٢٠,٠	٣,٠	٦٣٣	٠,٠٠٧
لحم خيول فقير الدهن	٢٠	١٢,٠	٧,٠	٥٥١	٠,٠٧٦
كبد بقري	٢٤	١٣,٠	٨,٥	٦٣٦	٠,١١٤
كرش مغسول	١٩	١٥,٠	٢,٧	٤٢١	٠,٠٠٤
ضرع	٧٩	٢٣,٠	٢١,٠	٨٩٧	١٣,٨٠٠
رئات بقري	٩٠	٨٤,٠	٢,٧	١٠٢٥	٠,٢٨٠
عظام طازجة	١٣	٣,٥	٤,١	٣١٣	٠,١١٣
مسحوق ريش	٨٨	٧٥,٠	٠,٧	١٨٣٧	٢,٥٧٠
لبن بقري	٢٦	١٣,٠	١١,٠	٥٨٥	٠,٠٥٩

* محسوبة = (بروتين مهضوم× ٢٣,٩١)+(دهن مهضوم (حيواني)× ٣٩,٧١)+ (دهن مهضوم (نباتي) × ٣٨,٨٧)+[(مستخلص خالي النيتروجين+ ألياف مهضومة)× ١٧,٥٦] .

ثالثاً : الجرذان Rats :

من الجرذان ما تبلغ حتى ٦٠ سم طول كلي (جرذان بنية برية) للذكور و٤٧ سم للإناث وطول الرأس والجسم ٣٧ ، ٢٧سم على الترتيب . وعموماً الجرذان البرية أثقل وزناً

عن جرذان المعمل . ويبلغ وزنها عند الميلاد حوالي ٥ جم وتزيد لأكثر من ٥٠٠ جم في الذكور الناضجة و ٣٥٠ جم للإناث . وتزن الذكور عند النضج الجنسي ٢٠٠ جم والإناث ١١٥جم .

وأسنان الجرذان متخصصة جداً وليس لها أسنان لبنية كما في معظم الثدييات وكل فك عليه ٤ أزواج من الأسنان ، وتستخدم في العض والعراك وحمل الغذاء وتكسير التربة .

والجرذان متنوعة التغذية Omnivores أي تأكل المواد النباتية وكذا الحيوانية ، وتفضل عامة الحبوب ، كما تتغذى على البيض والكتاكيت والطيور عامة والأرانب والفئران والسمك والحشرات والريش والسقط والملابس والورق وغيرها . ولسان الجرذان عضلي خشن ، وليس للجرذان كيس صفراء .

والجرذان ضعيفة الأبصار وتستعوض ذلك بالرائحة والصوت إذ لها حاستا شم وسمع قويتان . وتستمر فترة الحمل ٢٠ – ٢٤ يوماً ، وتلد مواليدها على فترة ١–٢ ساعة ، ويظهر شعر المواليد بعد ٤ أيام وتفتح آذانها بعد ١١ يوماً من الميلاد وتتفتح العيون في اليوم الرابع عشر من الميلاد .

ويخشى من عض الجرذان لاحتواء فمها على بكتريا تؤدي إلى حمى . وعموما فجرذان المعمل أقل خطورة وتختلف في سلوكها عن الأنواع البرية . فجرذان الألبينو Albino طورت بالانتخاب على مدار السبعين سنة السابقة من جرذان Rattus norvegicus والتي يطلق عليها الجرذان البنية ، الشائعة ، النرويجية ، الهانوفري والتي يمكنها التسلق والعوم وهي متعددة الألوان ويصل وزنها الناضج ٣٣٠جم ولها ١٢ – ١٤ حلمة (في الإناث) . وهذه الجرذان المعملية انتخبت لعدم هجومها على الحيوانات وعدم فرارها من الإنسان وعدم عقره (إلا إذا عانت من سوء المعاملة ونقص التغذية) . ومن هذه الجرذان المعملية ما هو خال من الجراثيم لأغراض دراسية معينة تستلزم خلو حيوان التجارب من الفلورا الميكروبية .

وفي المعمل يمكن بداية حمل الجرذان في عمر ٣ شهور ويمكن الحصول على بطن كل ٢١ – ٢٥ يوما وتستمر حياة الجرذان في المعمل لحوالي ٣ سنوات .

وتتطلب الجرذان طاقة مهضومة في العليقة بالكيلوچول / كجم حيز جسم تمثيلي يومياً على النحو التالي :

الحالة الفسيولوجية	الطاقة المهضومة في العليقة اليومية كيلو جول / كجم حيز جسم تمثيلي
للحفظ	٤٦٠
حيوانات سمينة	٣٩٠
حيوانات مفطومة	٩٤٠
حيوانات حامل	١,٢ (في أول الحمل) حتى ٢,٤ (في نهاية الحمل) مرة قدر احتياجات الحفظ
حيوانات مرضعة	٢٣٢٥ (١٠ صغار)

وتتطلب الجرذان كذلك ١٢٥٠ مجم بروتين صافي / كجم حيز جسم تمثيلي في العليقة الحافظة ، وأن تكون نسبة الطاقة / بروتين (كيلو جول طاقة مهضومة / جم بروتين خام) في العليقة ٢٦٥ / ١ للحفظ و ١/٨٠ للنمو ، وأن تحتوي العلائق ٤ ٪ بروتين خام للحفظ أو ١٢ ,٪ بروتين خام للنمو والتناسل ، كما تحتوي ٥٪ دهون ، ٠,٦ ٪ حمض لينوليك .

وتختلف كميات العلف المستهلك طبقاً لتركيز طاقة العلف . وينصح بتركيز الطاقة المهضومة (ميجا جول) التالي للجرذان :

الحالة الفسيولوجية	لكل جم علف	لكل سم^3 علف
للحفظ	١٥,٩	١٠,٥
للنمو		
بداية من الفطام	١٨,٣	١٢,١
حتى تمام النمو	١٥,٩	١٠,٥
رضاعة	٢٨,٥	١٨,٨

وعليه فيكون متوسط استهلاك العلف (كثافته من حيث الطاقة ١٦ ميجاجول طاقة مهضومة / كجم) كنسبة مئوية من وزن الجسم الحي على النحو التالي :

العمر بالأسبوع	نسبة استهلاك العلف	العمر بالأسبوع	نسبة استهلاك العلف
٣	١٦,٥	٨	٩
٤	١٥,٠	١٤	٦
٥	١٣,٠	٥٢	٣,٥ – ٤
٦	١١,٠		

وتستهلك الجرذان كميات العلف (٣٦٠٠ كيلو كالوري أو ١٥,٠٥ ميجاجول طاقة ميتابوليزمية / كجم) اليومية بالجرام كالتالي :

٪ من وزن الجسم النهائي المتوقع	جرذان نامية						جرذان تامة النضج	
	١٠	٢٠	٣٠	٤٠	٧٠	١٠٠		
العمر باليوم								
ذكور	٢٣	٣٣	٤٢	٥٣	١٠٨	٣٥٠	النضج الجنسي من عمر ٤٠–٦٠ يوما ، والتلقيح من عمر ٨٠ يوما	
إناث	١٩	٢٦	٣٥	٤٤	٩٦	٣٥٠		
وزن الجسم بالجرام								
ذكور	٥٥	١١٠	١٦٥	٢٢٠	٣٨٥	٥٥٠		
إناث	٣٢	٦٥	٩٨	١٣٠	٢٢٨	٣٢٥		
استهلاك يومي للغذاء بالجرام ذكور	٩	١٥	١٨	٢١	٢٠	١٩	١٩	٣٣
إناث	–	١٠	١٤	١٥	١٦	١٣	للحامل في ٨–٩ أجنة	للمرضع لعدد ٦ صغار

رابعا : الفئران Mice :

يتطلب الفأر في عليقته الحافظة ٧٣٥ كيلو جول طاقة مهضومة / كجم وحدة حيز جسم تمثيلي / يوم ، أو ١٥,٩ ميجاجول طاقة مهضومة / كجم علف نمو أو تناسل . كما يتطلب ٠,٣ ٪ حمض لينوليك . أما احتياجات البروتين الخام فهي ١٢,٥ ٪ في

عليقة النمو و ١٨٪ في عليقة التناسل . وتستهلك الفئران حوالي ٣-٤ جم علف / يوم .

خامسا : خنازير غينيا Guinea Pigs :

من آكلات النباتات ، وهي من القوارض ، تتطلب التغذية على أعلاف خشنة لتمام عمل الأسنان ولعدم الاتجاه لأكل الشعر ، ولها أعور متطور جدا ، ولا تخلق فيتامين (ج) مما يجعلها عرضة لأعراض نقصه (خطر الإسقربوط) ، طول فترة الحمل تجعل وزن المواليد كبيرة ومتطورة مما يجعلها تلتهم الأعلاف الخشنة بجانب اللبن .

وتستهلك خنازير غينيا من العلف (جم / يوم) :

حوالي ٥٠ - ٧٠ جم في حالة الحيوان تام النمو .

حوالي ٤٠ جم في حالة الحيوان النامي .

حوالي ٨٠ جم في حالة الحيوان أثناء التكاثر .

ويحتوي هذا العلف حوالي ١٢,٥ كيلو جول طاقة مهضومة / جم علف . كما يجب احتواء العلف على أقل من ١٪ أحماض دهنية غير مشبعة مع ١٠٪ ألياف خام و٢٠٠ مجم فيتامين (ج) لكل كيلو جرام علف . وبجانب كميات العلف المقترحة عاليه ينبغي تقديم بعض الدريس أو العلف الأخضر لخنازير غينيا .

كما يصلح علف الأرانب لتقديمه لخنازير غينيا بالكميات عاليه بجانب الدريس أو العلف الأخضر ، ولتطور عمل الأسنان يقدم الخبز الصلب الجاف ويحذر من تقديم قشر البطاطس وأشباهه خوفاً من خطر الإمساك الشديد . ويقدم الماء للاستهلاك بحرية الحيوان .

سادسا : الأرانب Rabbits :

من القوارض آكلة النباتات وحيدة المعدة ، لها أمعاء غليظة متطورة جدا ، وتتطلب علفا خشناً لإشباع وظيفة الأسنان (وتجنب الأنياب) والقناة الهضمية ، وعدم وفرة هذه المواد البنائية تحدث إسهالا ، ظاهرة أكل الروث Coprophagy أساسية للحصول على احتياجاتها من فيتامين (ب) والبروتين .

وتستهلك الأرانب كميات متباينة من العلف حسب وزنها وحالتها الفسيولوجية كما يتضح من الجدول التالي (الكميات كنسبة مئوية من وزن الجسم الحي مادة علف جافة / يوم

الحالة الفسيولوجية	للحفظ	للحمل	للنمو
وزن الجسم كجم			
٢,٣	٤,٠	٥,٠	٦,٠
٤,٥	٣,٣	٤,١	٥,٠
٦,٨	٣,٠	٣,٧	٤,٥

وتتطلب الأرانب النامية عليقة تركيزها ١٤,٢ ميجاجول / كجم طاقة مهضومة ، ٤٪ دهن خام ، ١٠٪ ألياف خام ، ١٦-٢٠٪ بروتين خام . وينصح في التسمين في حالة التغذية على هذا العلف الموحد (المضغوط) أن يقدم للاستهلاك منه بحرية الحيوان ، أو أن يقدم علف مضغوط (١٥٪ بروتين خام ، ٢,٧٥٪ دهن خام، ٥٪ ألياف خام) مع دريس كعليقة واحدة ، أو أن يقدم علف مخلوط من ٥٠ جم دريسا جيدا + ١٠٠ جم درنات + ٥٠ جم شعيرا + إضافات معدنية وفيتامينية لكل أرنب في اليوم وذلك كثلاث أنظمة للتسمين من الفطام (عمر ٣-٤ أسابيع) وحتى عمر ٨-١١ أسبوعاً ، بمتوسط زيادة يومية في الوزن حوالي ٣٨ جم ، واستهلاك علف في فترة التسمين هذه حوالي ٦ كجم (علف موحد) / حيوان ، وكفاءة غذائية حوالي ١ :٢,٨ .

أما في حالة النمو والتكاثر فتقدم للأرانب عليقة مكونة من ٨٪ مسحوق سمك (٦٤٪ بروتين خام) ، ١٩٪ كسب صويا مستخلص (٤٣٪ بروتين خام) ، ٢٨٪ مسحوق برسيم حجازي ، ٣٧٪ ردة قمح ، ٣٪ زيت صويا مكرر ، ٣٪ مخلوط معادن ، ٢٪ مخلوط فيتامينات .

سابعا : الهامستر Hamster :

من القوارض التي تشبه الجرذ ، وله وجنات يخزن بها الحبوب ، هو آكل نباتات ، ثنائي المعدة ، متطلباته الغذائية تشبه التى للفأر وللجرذ ، ويربى بعد التجنيس كل جنس منفصلا عن الآخر ؛ لذلك تكون الإناث بعد شياعها عدوانية .

بعض المعلومات الأساسية عن حيوانات التجارب :

البيان	فيران	جرذان	هامستر	خنازير غينيا	أرانب*
العمر عند التلقيح	٥٦–٧٠ يوما	٩٠–١٠٠ يوم	٥٦–٧٠ يوماً	٣–٤ شهور	٦–١٢ شهرا
دورة شياع	٤–٥ أيام	٤–٥ أيام	٤ أيام	١٦ يوما (١٣–٢٠)	١٥–١٧ يوما
مدة شياع	حوالي ١٣ ساعة	حوالي ١٤ ساعة	حوالي ٦ ساعات	حوالي ٥٠ ساعة	تبويض بعد التلقيح
مدة حمل	١٩ يوما (١٨–٢١)	٢١ يوما (٢٠–٢٣)	١٦ يوما	٦٣ يوما (٦٢–٦٨)	٣١ يوما (٢٣–٣٤)
أول شياع بعد الولادة	أقل من ٢٤ ساعة	أقل من ٢٤ ساعة	٤–٦ أيام	أقل من ٢٤ ساعة	١–٢ يوم
عدد المواليد/بطن	٦–١٢	٦–١٢	٦–٨	٣–٤	٥–٨
عمر الفطام	١٨–٢١ يوماً	حوالي ٢١ يوماً	حوالي ٢١ يوما	حوالي ٢١ يوما	حوالي ٣٥ يوما
نضج جنسي	٢٨–٣٥ يوما	٥٠–٧٠ يوماً	٢٨–٤٠ يوما	٧٠ يوما (إناث ٢١–٢٨) يوما	٩٠–١٢٠ يوما
وزن الميلاد	١–١,٥ جم	٤–٦ جم	٢–٣ جم	٧٠–١٠٠جم	حتى ١٠٠ جم
وزن الفطام	٨–١٤ جم	٤٠–٥٠ جم	٣٥–٤٠ جم	١٨٠–٢٠٠جم	حسب السلالة
وزن تام النمو	٢٠–٣٥ جم	٢٥٠–٥٥٠ جم	١٠٠–١٢٥ جم	٧٠٠–١٠٠٠جم	١–٧,٥ كجم
استهلاك العلف/يوم	٣–٦ جم	١٢–١٥ جم	٨–١٢ جم	حوالي ٣٥ جم	٤٠ جم / كجم وزن جسم
استهلاك ماء شرب/يوم	٤–٧ مل	١٥–٢٥ مل	٨–١٠ مل	٥٠–١٠٠ مل	٦٠–١٤٠ مل

* تتوقف قيم الأرانب على سلالاتها لحد كبير .

وقتل الحيوانات التجريبية يجب أن يتم بطريقة إنسانية وعلى انفراد بعيدا عن باقي الحيوانات ، ويتم ذلك بصعق الحيوان أو فصل عنقه ، أو استنشاق غازات سامة كأول أوكسيد كربون ، ثاني أوكسيد الكربون ، النيتروجين ، إيثير ، كلوروفورم وذلك في حجرة إعدام . وقد يستخدم مخلوط كلوروفورم / رابع كلوريد كربون بنسب متساوية للإعدام . كما يتم الإعدام بالحقن في الوريد بكبريتات ماغنسيوم مشبعة أو بالباربيتيورات ٤٣ مجم / كجم (عن طريق الفم كذلك) .

وللتخدير يستخدم الإيثير ، كلوروفورم (ماعدا الفئران ؛ لأنه يؤثر على خصوبتها وقد يودي بحياتها) ، ثاني أوكسيد الكربون / أوكسچين (٨٠/٢٠) ، إيثيل كلوريد ، تريلين ، هالوثان (فلوثان) ، سيكلوبروبان (مع أوكسچين) ، أوكسيد نيتروز ، إيزوفلوران ، إنفلوران ، ميثوكسي فلوران وكلها تستخدم بالاستنشاق ، بينما التخدير بالحقن يستخدم

فيه البنوثال(ثيوبنتون صوديوم) بالحقن الوريدي ، وكذلك النمبيوتال (بنتو باربيتون صوديوم) واليورثان والكلورالوز وباربيتورات ، ثيوباربيتورات (ثياميلان) ، ميثوهيكسيتال ، ثيوبنتال ، باربتيال ، فينوباربيتال ، بنتوباربيتال سيكلوباربيتال ، أموباربيتال ، ومن المخدرات الموضعية الكوكايين ، بروكايين ، تتراكايين ، كلور بروكايين ، ليدو كايين ، دي بوكايين، مبيڤاكايين .

ويؤدي أحيانا الكلوروفورم والهالوثان عند استخدامهما للتخدير إلى التهاب كبدي Hepatitis في حالة من كل ١٠-١٠٠ ألف حالة .

وللتنبيه للتنفس (بعد زيادة الباربيتيورات) يحقن وريدياً أو في البريتون بالبيميجريد (١٠ مجم / كجم) أو الليبتازول (٥ مجم / كجم) ، وإذا وقف التنفس فيستخدم التنفس الصناعي .

ويوضح الجدول التالي بعض البيانات التناسلية للحيوانات التجريبية :

نوع الحيوان	فترة الحمل	عدد الأفراد / بطن	الوزن عند التزاوج جم	الوزن عند الفطام جم
النسناس	٢٤ أسبوعا	١	٤٥٠٠-٩٠٠٠	٧٠٠-٨٠٠
قطة	٦٤ - ٦٦ يوما	٣ - ٦	٢٥٠٠	متباين
كلبة	٦٠ يوما	٣ - ٨	متباين	متباين
أرنبة	٣٠ - ٣٢ يوما	٥ - ١٠	١٥٠٠-٣٠٠٠	١٠٠٠-١٥٠٠
خنزير غينيا	٦٢ - ٧٢ يوما	٣ - ٥	٥٠٠-٥٥٠	١٨٠-٢٠٠
الجرذ	٢٠ - ٢٧ يوما	٤ - ١٠	٨٠-١٥٠	٣٥-٤٠
فأر	١٩ - ٢١ يوما	٦ - ١١	١٨-٢٠	١٠-١٢
هامستر ذهبي	١٦ يوما	٥ - ٩	١٠٠	٤٠

وينبغي توفير علائق متزنة متجانسة ، توفر احتياجات الحيوانات من البروتين والطاقة (كربوهيدرات ودهون) والڤيتامينات والعناصر المعدنية . ويوصي بأن تحتوي العليقة ٢٧٪ من أزوتها كأحماض أمينية كبريتية (مثيونين + سيستين للعلائق المحتوية بروتين حيواني)، أو ٢٧٪ من أزوتها كليسين (إذا كانت الحبوب هي مصدر البروتين الأساسي في العليقة)،

أو ٩٪ من أزوتها كتربتوفان (للعلائق التي بروتينها أساسا من الأذرة) .

مثال لعليقة الجرذان كحيوانات تجريبية :

مكونات العليقة	النسب المئوية
حبوب قمح	٣٢
حبوب أذرة صفراء	١٦
مسحوق لبن جاف منزوع الدهن	٢٠
زيت بذرة قطن مهدرج	١٥
مسحوق لحم	١٠
مسحوق برسيم حجازي	٢
خميرة جافة	١
مخلوط ڤيتامينات (ب) المركبة*	١
مخلوط ڤيتامينات ذائبة في الدهن**	١
مسحوق سليلوز	١
ملح طعام	٠,٥
كبريتات منجنيز	٠,٠٢
مسحوق كبد	٠,٤٨

* مخلوط ڤيتامينات (ب) المركبة يحتوي كل جم منه علي :

ثيامين ٠,٦ مجم ، ريبوفلاڤين ١,٢ مجم ، بيريدوكسين ٠,٤ مجم ، نياسين ٥ مجم ، بانتوثينات كالسيوم ٤ مجم ، حمض أمينو بنزويك ٢,٥ مجم، إينوستيول ١٠٠ مجم، كولين كلوريد ٢٠٠ مجم ، مركزات كبد ٢٥ مجم ، بيوتين ١ ميكروجرام ، حمض فوليك ١ ميكروجرام ، سيانوكوبل أمين ١ ميكروجرام ، مسحوق سليلوز حتى ١ جم .

** مخلوط ڤيتامينات ذائبة في الدهن يحتوي كل جم منه على :

ڤيتامين (A) ٢٠٠ وحدة ، ڤيتامين (D) ٢٠ وحدة ، الفاتوكوفيرول ١٢ مجم ، ميناديون ١٠٠ ميكروجرام ، زيت قطن حتى ١ جم .

أو قد تتكون العليقة (مثال للفئران والجرذان) التجريبية كالتالى :

المكونات	النسبة المئوية
قمح	٤٠,٠
شعير	٣٣,٣
دهن	٢,٠
مسحوق برسيم	٥,٠
مسحوق سمك	٥,٠
كسب فول صويا مستخلص	٧,٥
خميرة	٢,٠
مولاس	٣,٠
مسحوق عظام	١,٣
كربونات كالسيوم	٠,٣
ملح طعام	٠,٥
مخلوط معادن	٠,١
	١٠٠,٠

وفي حالة العليقة نصف المخلقة (النقية) فتتكون من :

المكونات	النسبة المئوية
نشا أذرة	٣٨,٨
بروتين صويا	١٩,٠
سليلوز	٦,٠

المكونات	النسبة المئوية
زيت صويا مكرر	٤,٠
سكروز	١٠,٠
بولي بروبيلين	١٨,٠
مخلوط معادن	٣,٥
مخلوط ڤيتامينات	٠,٧
	١٠٠,٠

الكميات المقترحة من العلف والماء لبعض الحيوانات التجريبية :

الحيوان	المأكول جم / يوم	ماء الشرب مل / يوم	ملاحظات
الفئران	٥	٦	
جرذ	١٥	٢٤	
هامستر	١٠	٨	
خنازير غينيا	٣٠	٨٥	تتطلب مصدراً لڤيتامين (ج) + دريساً .
أرانب	١٠٠	٣٣٠	تتطلب دريساً مدة إنتاج اللبن .
النسناس	٤ ٪ من وزن الجسم	متباين	يتطلب مصدراً لڤيتامين (ج) .
القطط	٤ ٪ من وزن الجسم	١٠٠-١٥٠	عليقة من ٥٠ ٪ لحم مطبوخ + ٤٣ ٪ بطاطس مطبوخة + ٦,٥ ٪ مسحوق حبوب + ٠,٥ ٪ معادن .

ثامناً : السمان :

ويعتبر طائر السمان (السلوى) من أكثر الحيوانات (الطيور) التجريبية استخداماً . وهو يماثل الدجاج لحد كبير في رعايته وإنتاجه مع القليل من الفروق بينهما فيما يلخصه الجدول التالي :

وجه المقارنة	الدجاج	السمان
التفريخ : درجة الحرارة	١٠٢ – ١٠٤ْ ف	٩٩ – ١٠٠ْ ف
الرطوبة	٥٥ – ٦٠٪	٦٠ – ٧٥٪
التقليب	٣ – ٤ مرات يوميا	٢ – ٣ مرات يوميا
الفرز	مرتان يوما ٧ ، ١٤	مرتان يوميا ٥ ، ١٣
مدة التفريخ	٢١ يوما	١٨ – ٢٣ يوما
وزن الكتكوت	٢٥ – ٤٠ جم	٦ – ٩ جم
الحضانة : المدة	٨ – ١٢ أسبوعا	٣ – ٥ أسابيع
الحرارة	٩٥ – ٦٠ْ ف	٩٥ – ٧٠ْ ف
الرطوبة	٥٠ – ٦٠٪	٥٠ – ٧٠٪
التغذية اليومية	١٥ – ٩٠ جم	٢,٥ – ١٢,٥ جم
البروتين	٢٠ – ٢٢٪	٢٨٪
الطول على الغذاية	٣ – ٦ سم	١ – ١,٥ سم
وزن الكتكوت	٧٥٠ جم	١٥٠ – ٢٠٠ جم
الرعاية : التغذية اليومية	٩٥ – ١١٠ جم	١٥ – ٤٥ جم
البروتين	١٥ – ١٨٪	١٨ – ٢٢٪
الطول على الغذاية	٦ – ٨ سم	٢ – ٣ سم
الوزن	١,٥ كجم	٢٥٠ – ٤٥٠ جم
الأمهات : التغذية اليومية	١٣٠ جم	٩٠ جم
البروتين	١٦ – ٢٠٪	٢٤٪
الطول على الغذاية	٨ – ١٠سم	٤ – ٦ سم
الوزن	١,٧٥ – ٣,٥٠ كجم	٤٥٠ – ٥٥٠ جم
إنتاج البيض	١٥٠ – ٣٠٠ بيضة	٢٥٠ – ٣٠٠ بيضة
وزن البيضة	٤٥ – ٦٠ جم	١٠ – ١٥ جم
النضج الجنسي	٦ – ٩ شهور	١,٥ – ٤ شهور

ولتحضين السمان صناعيا (بعيدا عن آباء الكتاكيت) يراعى توفير برنامج تدفئة كالموضح في الجدول التالي :

العمر باليوم	نوع السمان	
	بوب وايت	ياباني
١	٩٥,٠ ف	٩٥ ف
٤	٩٢,٥	٩٥
٨	٩٠,٠	٩٠
١٢	٨٧,٥	٨٥
١٥	٨٥,٠	٨٠
١٨	٨٢,٥	٧٥
٢١	٨٠,٠	٧٠
٢٨	٧٥	—
٣٥	٧٠	—

ومن سلوك الكتاكيت يمكن الحكم على مدى ملاءمة البرنامج الحراري ، وقد يضطر إلى رفع الحرارة في حالة تجمع الكتاكيت حول مصدر التدفئة ، أو يضطر إلى خفض الحرارة عند تباعد الكتاكيت إلى أطراف الحضانة بعيدا عن مصدر التدفئة .

ويلزم لحضانة السمان كذلك برنامج إضاءة خاص كالموضح بالجدول التالى :

العمر باليوم	عدد ساعات الإضاءة
١ – ٣	٢٤
٤ – ٧	٢٣
٧ – ١٠	٢٢
١٠ – ١٣	٢١
١٣ – ١٦	٢٠
١٦ – ١٩	١٩
١٩ – ٢٢	١٨
٢٢ – ٢٥	١٧
٢٥ – ٢٨	١٦
٢٨ – ٣١	١٥
٣١ – ٣٤	١٤

وخلال تلك الفترة تحصل كتاكيت السمان على كميات العلف المقررة على عدة وجبات يومية كما يوضحها الجدول التالي :

العمر بالأسبوع	كمية العلف اليومي جم	عدد الوجبات اليومية	وزن الكتكوت جم	فرق النمو جم	معدل النمو اليومي جم
١	٢,٥	٨	٦ – ٣٥	٣٠	٤,٥
٢	٥,٠	٧	٣٥ – ٦٥	٣٠	٤,٣
٣	٧,٥	٦	٦٥ – ١١٥	٥٠	٧,٠
٤	٩,٥	٥	١١٥ – ١٥٥	٤٠	٥,٨
٥	١٢,٥	٥	١٥٥ – ٢٠٠	٤٥	٦,٠

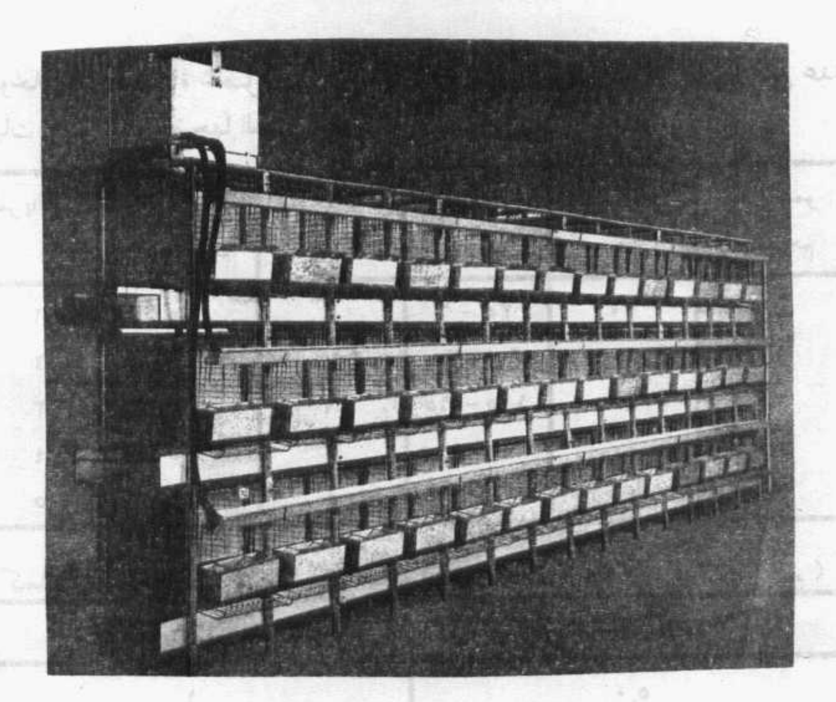
كما تشرب الكتاكيت كميات المياه التالية (مقدرة باللتر / ١٠٠٠ كتكوت / يوم) :

العمر بالأسبوع	كمية ماء الشرب
١	٥,٠
٢	٧,٥
٣	١٠,٠
٤	١٢,٥
٥	١٥

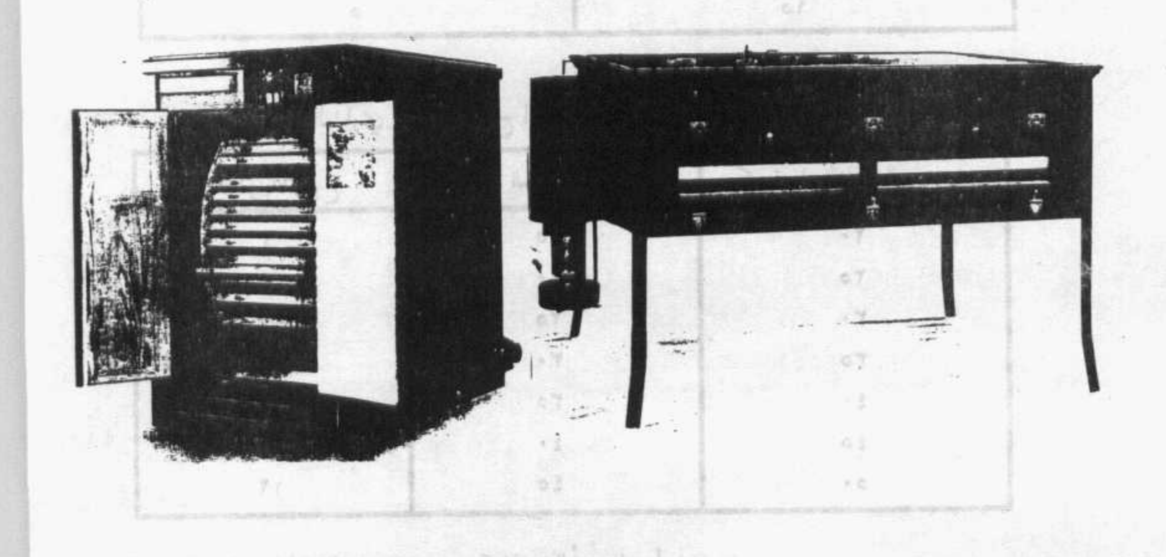
بينما في عمر البداري لسمان إنتاج اللحم تتناول المقررات الغذائية وماء الشرب التالية :

العمر بالأسبوع	كمية العلف اليومى جم	كمية ماء الشرب اليومي مل
٦	١٥	٢٠
٧	٢٠	٢٥
٨	٢٥	٣٠
٩	٣٠	٣٥
١٠	٣٥	٤٠
١١	٤٠	٤٥
١٢	٤٥	٥٠

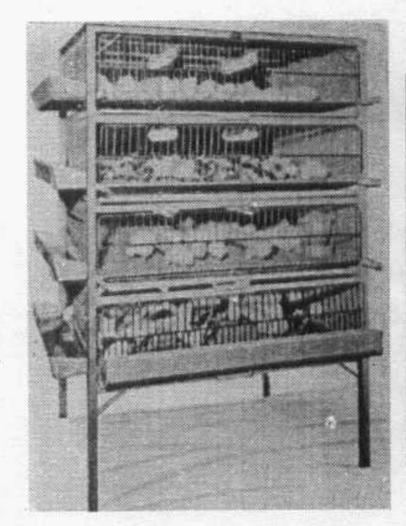
وإلى الحيوانات التجريبية تنتمى كذلك الأسماك بأنواعه

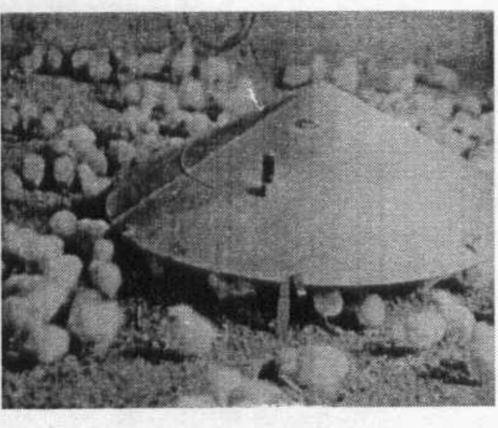


(شكل ٤٧) بطارية دجاج بياض تخدم على جهة واحدة



(شكل ٤٨) نماذج لمفقس (آلة تفريخ) البيض





(شكل ٤٩) طرق تحضين الكتاكيت

المراجع :

- رضوان محمد بلال (١٩٨٨) : زراعة السمان فى المزارع والعنابر المعدلة – مكتبة ابن سينا – القاهرة .

- عبد الحميد محمد عبد الحميد (١٩٩١) : رعاية حيوانات المزرعة –دار النشر للجامعات المصرية – مكتبة الوفاء – القاهرة .

- عبد الحميد محمد عبد الحميد (١٩٩١) : رعاية الكلاب – مكتبة مدبولى – القـاهرة.

- دار النشر للجامعات المصرية – مكتبة الوفاء – القاهرة .

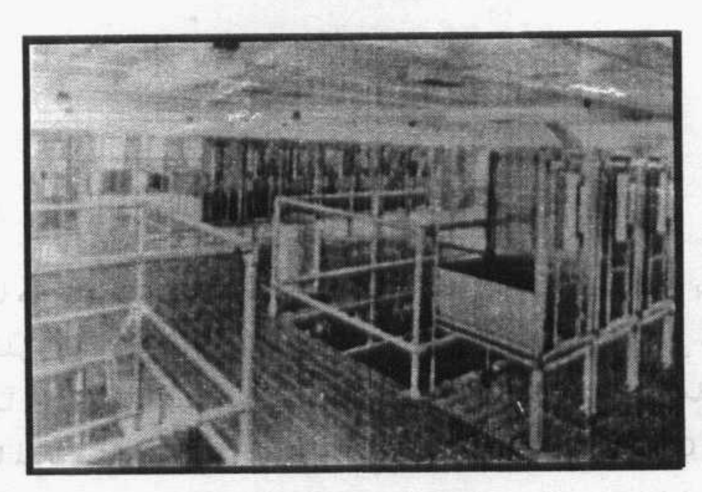
- Feltwell, R. & Fox , S. (1980) Practical Poultry Feeding , Whit stable Kent, London .
- Kirchgessner , M . (1978) Tierernahrung .3 . Auflage DLG - Verlag Frankfurt (Main) .
- Leibetseder , J . (1979) Die Ernahrung des Hundes. Information Tierernahrung, Roche Basel , Schweiz .
- Russell , F.C. (1948) Diet in relation to reproduction and the Viability of the young Part 1 : Rats and other Laboratory animals , Commonwealth Bureau of Animal Nutrition , Aberdeen. Scott Land Technical Communication No . 16 .
- Short , D.J. & Woodnott D.P. (1969) Manual of Laboratory Animal Practice and Techniques.s Crosby & Son , London .

الفصل الثالث
تجارب الهضم

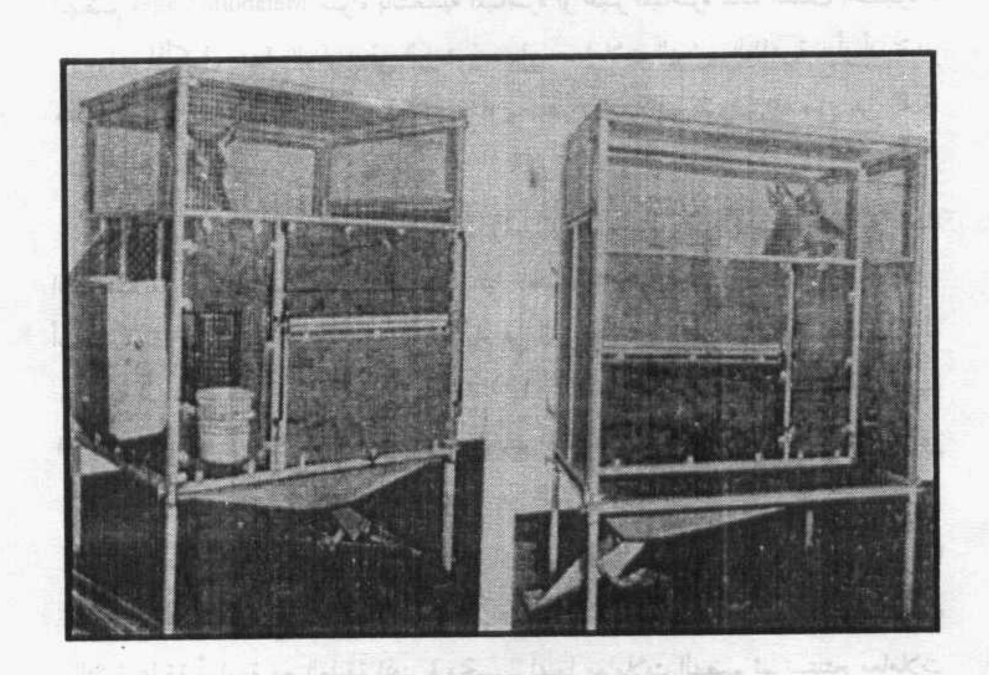
كما هو معلوم ليس المهم فقط ما تحتويه مواد العلف من عناصر غذائية ، بقدر ما هو مهم القدر المهضوم من محتواها الغذائي ، وعلى ذلك ليس المهم فقط تحليل مادة علف لمكوناتها ، بل يجب تدعيم هذه النتائج بتقييم مادة العلف من حيث معاملات هضم مكوناتها لمعرفة قيمة مادة العلف الإنتاجية . ويتم حساب معاملات الهضم Digestion Co-efficients بعمل تجارب هضم Digestion Trials على الحيوانات In vivo في صناديق الهضم Metabolic Cages سواء بالتغذية المباشرة أو غير المباشرة لمادة العلف المختبرة ، وحساب المأكول منها والخارج في الروث وحساب معاملات الهضم الظاهرية ، أو أن تقدر معملياً In vitro وهي تختلف لحد كبير أو بسيط لاختلاف ظروف المعمل عن القناة الهضمية للحيوان .

وفي التقدير على الحيوانات عادة تكون ذكورا بالغة ، وتمر بفترة تمهيدية لتفريغ القناة الهضمية من الغذاء السابق (١-٣ أسابيع في الغنم و ٤-٥ أيام في الدواجن) ، ثم بفترة أساسية (١-٢ أسبوع في الغنم و ٣-٥ أيام في الدواجن) يسجل فيها الكميات المأكولة وكمية الروث ، مع أخذ عينات من الروث (١٠-٢٥٪) للتجفيف والتحليل (من العينة المركبة لكل الفترة الرئيسية) . وقد تستخدم المرقمات Markers في أول وآخر الطور الرئيسي. وقد يجمع الروث في أكياس بعيدا عن البول .

وتحلل مادة العلف ويحلل الروث . وإذا كانت مادة العلف المختبرة لا تؤكل بمفردها فلابد من عمل تجربتي هضم ، الأولى على عليقة أساسية وتحسب منها معاملات هضمها، والثانية عليقة أساسية مع العليقة المختبرة وتحسب لهما معاملات الهضم ثم تستنتج معاملات هضم المادة المختبرة بالفرق ، وهو النظام المسمى بتجربة هضم غير مباشرة أو التغذية غير المباشرة By Difference Method or Indirect Feeding ، ومن معاملات الهضم تحسب الكمية المهضومة أو المركبات المهضومة الكلية فى العلف .



صناديق هضم فردية ومزدوجة بحاجز يمكن إزالته



(شكل ٥٠) صناديق هضم وميتابوليزم

معامل هضم أي مغذي = ١٠٠−١٠٠ [(٪ للمرقم في العلف × ٪ للمغذي في الروث) / (٪ للمرقم في الروث × ٪ للمغذي في العلف)]

وإذا أخذ في الاعتبار نسبة المعاد اكتشافه من المرقم فيكون معامل هضم أي مغذي =

١٠٠ − (٪ للمعاد اكتشافه من المرقم × ٪ للمرقم في العلف × ٪ للمغذي في الروث) / (٪ للمرقم في الروث × ٪ للمغذي في العلف) .

وقد تحسب معامل هضم المادة الجافة باستخدام الدليل من المعادلة التالية كذلك :

معامل هضم المادة الجافة ٪ = ١٠٠× (٪ للمرقم في الروث − ٪ للمرقم في الغذاء) / (٪ للمرقم في الروث) .

وتستخدم المرقمات Markers في تغذية الحيوان ، إما لتقدير وقت مرور الكتلة الغذائية في القناة الهضمية ، أو لتقدير معاملات الهضم والحجوم للكرش، أو معدل التدفق في ٢٤ ساعة. ومن المرقمات ما هو سائل (صبغات Dyes فاستخدم بولي إيثيلين جليكول Polyethylene Glycol أو معقد إيثيلين دي أمين تترا حمض الخليك للكروم Cr EDTA ، وتم تعليم ذراتها بالنظير المشع لتتبعها، وبعدا عن الإشعاع أمكن تقدير Cr EDTA بجهاز مطياف الامتصاص الذري AAS، كما أمكن تقدير الكروم من هذا المعقد بواسطة سبكترومتر فلورسنتي بأشعة إكس). ومن المرقمات كذلك ما هو صلب (كاللجنين ، السليكا أو الرماد غير الذائب في الأحماض ، أوكسيد الحديديك ، أوكسيد الكروم Cr_2O_3 وبعض العناصر النادرة الأرضية التي لها سلوك غروي إشعاعي مثل Dysprosium والسيريوم Cerium (^{144}Ce) الذي نصف عمره ٢٨٥ يوما ، معقد ^{103}Ru مع الفينانثرولين أو مخلوط ^{51}Cr EDTA مع ^{103}Ru - Phen ، والبولي إيثيلين ، الألكانات Alkanes (كهيدروكربونات كشمع البرافين وتقدر بالكروماتوجراف الغازي ومصادرها الطبيعية في المراعي أو كإضافات وأفضلها ك٣٢ من حيث إنها تعطي أعلى اكتشاف في الروث) ، واليتربوم Ytterbium (كمركب طبيعي في المراعي يزال بمحلول المنظفات المتعادل) .

وتمكن المرقمات Indicators عموما ، والكروم خصوصا من قياس الروث ببساطة عن وزنه فيغني ذلك عن الجمع الكمي للروث . خاصة وأن أوكسيد الكروم Cr_2O_3 يتم اكتشافه بمعدل عال يبلغ ٩١,٤ ± ٥,٧٦٪ (٧٢,٣ − ١١١,٦٪) ؛ لذلك فهو أكثر المرقمات استخداما في تقديرات معاملات الهضم .

ولتقدير أوكسيد الكروم يلزم تحضير المحاليل التالية :

مخلوط هضم :

أذب ١٠ جم موليبدات صوديوم في ١٥٠ مل ماء مقطرا ، وببطء أضف ١٥٠ مل حمض كبريتيك مركزا ، وبرد المخلوط ، وببطء أضف مع التقليب ٢٠٠ مل حمض بيركلوريك ٧٠ ٪ .

دليل ملون :

أذب ۰,۲٥ جم دي فينيل كاربازيد Diphenyl Carbazide في ۱۰۰ مل محلول ماء / أسيتون (۱:۱) ، يحضر طازجاً يومياً .

التقدير :

زن عينة تحتوي ۱٥۰ – ۱۲۰۰ ميكروجرام أوكسيد كروم Cr_2O_3 في دورق كلداهل سعة ۱۰۰ مل ، أضف ۱۰ مل مخلوط هضم ، سخن ۳۰ دقيقة (في أول ۱٥ دقيقة يتحول لون المهضوم من الأخضر إلى الأصفر أو البرتقالي) . ابعد المهضوم عن النار وبرد إلى حرارة الغرفة ، خفف إلى ٥۰۰ مل بالماء المقطر . انقل ٥ مل من المهضوم المخفف إلى أنبوبة اختبار ثم أضف ٤,٥ مل حمض كبريتيك ۰,۲٥ أساسي (عياري) ، أضف ۰,٥ مل دليل ملون بسرنجة ، اخلط واترك على الأقل ۳ دقائق لتكوين اللون الذي يقدر شدته على طول موجة ٥٤۰ نانوميتر (ميلميكرون) ضد عينة خالية Blank من ۹,٥ مل حمض كبريتيك ۰,۲٥ أساسي + ۰,٥ مل دليلا ملوناً . مع عمل منحنى قياسي Standard Curve من أوكسيد الكروم الجاف لمدة ساعتين على ۱۲۰°م ويجرى عليه نفس ما أجرى على العينة من إضافة حمض الكبريتيك والدليل الملون لقياس شدة الكثافة الضوئية لتركيزات مختلفة للكروم .

كما يمكن تقدير أوكسيد الكروم بطريقة ضوئية مطورة تمكن من قياس ٤۰ عينة في اليوم ، وذلك بترميد عينات العلف أو الروث في فرن ترميد Muffle Furnace لمدة ليلة على ٤٥۰°م ، ثم تبرد ويضاف إليها ۱٥ مل مخلوط هضم [مكون من ۱۰ جم موليبدات صوديوم مذابة في ٥۰۰ مل مخلوطا من ماء مقطر / حمض كبريتيك مركز / حمض بيركلوريك (۷۰٪) ۱٥/۱٥/۲۰] ، ويتم التسخين على سخان كهربائي حرارة سطحه ۳۰۰°م حتى يتحول اللون إلى الأصفر أو الأحمر ، ويستمر التسخين بعدها ۱۰–۱٥ دقيقة ثم تبرد ، تنقل المحتويات المهضومة إلى دورق معياري سعة ۲۰۰ مل ويكمل للعلامة ، يؤخذ منها ۱۰ مل في أنبوبة (بوليسترين سعة ۱۷×۱۰۰م بغطاء بوليثيلين) ويعمل لها طرد مركزي لمدة ٥ دقائق ، وتقاس الكثافة الضوئية على ٤٤۰ نانومتر ضد عينة خاوية من الماء المقطر ، مع عمل منحنى قياسي لكميات من أوكسيد الكروم النقي متباينة (٥–٦۰مجم) .

ولقد وجد أن المعاد اكتشافه من أوكسيد الكروم في الروث يبلغ ۸۲,۹٪ ± ۱۱,۱٪ (في حالة إضافة الورق المشبع بأوكسيد الكروم داخل الكرش) أو ۹٤,٤ ± ۷,۹٪ (في حالة إضافة مسحوق أوكسيد الكروم المخلوط مع الشعير) أو ۹۸,۰ ± ۲,۷٪ (في حالة إضافة مسحوق أوكسيد الكروم كمعلق مع زيت الفول السوداني إلى فتحة الكرش

Cannula) ، أو ٩٤,١ ± ٢,٢ ٪ (عند خلط أوكسيد الكروم مع مطحون القش) .

ويمكن كذلك تقدير أوكسيد الكروم بطريقة بسيطة وسريعة ومتخصصة بوزن ١ جم عينة (تحتوي ٣-٧ مجم أوكسيد كروم) في دورق معياري مع إضافة ١-٥ مجم موليبدات صوديوم و ١٠ مل حمض نيتريك . ويتم الغليان ببطء حتى يصير حجم الحامض إلى النصف في حدود ١٠ دقائق . تبرد العينة ، ويضاف ٥ مل حمض بيركلوريك ٧٠ ٪ . يغلي مع الخلط لتمام الأكسدة في مدة ١٠ - ١٥ دقيقة . برد العينة وأكمل للعلامة بالماء . اطرد مركزيا أو اتركها لترسيب السيليكا . قدر شدة الكثافة الضوئية على ٤٤٠ نانوميتر ضد محاليل معلومة التركيز من دي كرومات بوتاسيوم لتعطي مدى من تركيزات أوكسيد الكروم ١٠-٨٠ جاما / مل .

تقدير البولي إثيلين Polyethylene :

البولي إيثلين ثابت ضد أحماض النيتريك والكبريتيك المركزان ، فبإذابة المادة العضوية بالغليان في مخلوط من هذين الحامضين ، يفصل البولي إيثلين في قمع فصل ، ويجمع في بوتقة بورسلان ويبخر البولي إيثيلين في فرن احتراق ويقدر بالوزن :

١ ـ يوزن ٢ جم عينة بالضبط في كستبان استخلاص ويضاف إليها ٢٥ مل حمض نيتريك (٦٥ ٪ وزن / حجم) + ١٠ مل حمض كبريتيك (٩٦ ٪ وزن / حجم) . اتركها ليلة قبل التسخين .

٢ ـ سخن محتويات الكستبان لمدة ساعتين في حمام ماء يغلي مع تجنب الغازات بإجراء الهضم في خزانة غازات .

٣ ـ انقل المحلول إلى قمع فصل باستخدام الماء ، واتركه حتى يطفو البولي إيثلين على السطح . اسحب المحلول خالي البولي إيثيلين بحرص ورج المتبقي المحتوى على البولي إيثلين في قمع الفصل مع ١٥ مل كلوروفورم لمدة دقيقة .

٤ ـ بعد سحب الكلوروفورم ، انقل البولي إيثيلين إلى بوتقة ترشيح بورسلان بالأسيتون، وأزل الأسيتون بالتفريغ ثم جفف البوتقة إلى ثبات وزنها (١٠٣ م لمدة ساعة) واتركها تبرد في مجفف واوزن بسرعة .

٥ ـ ضع البوتقة في فرن ترميد لمدة ١٥ دقيقة على ٦٠٠ °م ، واتركها تبرد في مجفف وزنها مباشرة بسرعة .

فالفقد في الوزن بالحرق هو وزن البولي إيثيلين فيعبر عنه كنسبة مئوية .

وللتنبؤ بمعامل هضم مادة العلف معمليا فقد أجرى تعديل على نظام المنظفات بأن استخدم إنزيم الفا ـ أميلاز ، لتحويل النشا إلى سكريات ذائبة أثناء الهضم بمحلول

المنظفات المتعادل ، لاستخلاص الألياف المتعادلة ، التي تغسل بالماء الساخن ، وتهضم بإنزيم السليولاز ، وبعدها تجمع المادة غير المهضومة لتقدير مادتها العضوية ، مع تقدير الرماد الكلي في العينة لحساب النسبة المئوية للمادة العضوية المهضومة بمحلول المنظفات المتعادل والسليولاز (NCD) ، وفى هذا التكنيك ينزع الدهن من العينة (٠,٥ جم) ، ثم تطحن لتمر من منخل ١ م. تنقل العينة الجافة هوائيا ومستخلصة الدهن إلى قابلة ١٥٠مل ، ويضاف إليها ٢٥ مل محلول منظفات متعادلا + ٠,٥ مل محلول مانع للفوران (٢,٥ مل سليكون ترج مع ٢٥٠ مل ماء) . توصل القابلة بمكثف عاكس ، ويغلي ٠,٥ ساعة. أطفئ السخان وأضف ٢٥ مل محلول منظفات متعادلا باردا + ٢ مل محلول الفا- أميلاز (٢ جم تذاب في ٩٠ مل ماء ، وترشح ويضاف إلى الراشح ١٠ مل ٢- اثوكسي إيثانول وتحفظ على ٥°م) اغل ٠,٥ ساعة . رشح واغسل (٣ مرات × ٢٠ مل) بالماء الساخن . ينقل الراسب إلى قابلة مع ٢٥ مل ماء ساخنا (٨٠°م) + ٢ مل محلول إلفا - أميلاز واخلط جيداً واتركها ١٥ دقيقة . رشح وخذ الراسب مع ٣٠ مل محلول سليولاز يحضر يومياً بإذابة ٢٠ جم سليولاز + ٠,١ جم كلورامفينيكول + لتر محلول منظم (١,٣٦ جم خلات صوديوم + ٥٠٠ مل ماء + ٠,٦ مل حمض خليك ثلجيا وأكمل إلى لتر) ، هز وحضن على ٤٠°م لمدة ساعة على الأقل) واغلق الآنية ، وهز لخلط الألياف مع السليولاز. حضن على ٤٠°م ± ٢°م لمدة ٢٤ ساعة مع الرج صباحاً ومساء . رشح واغسل مع سحب الراشح بالتفريغ ، ثم اغسل الألياف غير المهضومة بماء ساخن ثم بالأسيتون ٢٠ مل مرتين. جفف المتبقي لمدة ليلة على ١٠٠ ± ٢°م وبرد واوزن . احرق على ٥٥٠°م لمدة ٤ ساعات وبرد وأعد الوزن ، واحسب النسبة المئوية للمادة العضوية غير المهضومة على أساس المادة الجافة وتقدر الرماد الكلية في عينة من هذه المادة العلفية المدروسة ، وتنسب كذلك للمادة الجافة . فتكون النسبة المئوية للمادة العضوية المهضومة بالمنظفات المتعادلة والسليولاز = ١٠٠ - (٪ مادة عضوية غير مهضومة + ٪ رماد كلي) .

هذا وقد طورت طريقة مماثلة للتنبؤ بمعامل الهضم والقيمة الحرارية (القابلة للتمثيل والصافية) للأعلاف المخلوطة في وقت أقل من السابقة وبنفس دقتها وشديدة الارتباط بالقيم البيولوجية المأخوذة على الحيوانات ، إلا أنها توفر الوقت (عن التجارب البيولوجية على الحيوان أو التجارب المعملية الأخرى) ، والمال (لا تحتاج لحيوانات أو سائل كرش) ، وتحافظ على صحة الحيوان (لعدم الحاجة لعمل فتحة كرش مستديمة) ، كما أنها بسيطة وقليلة العمل وسهلة التكرار فتصلح للعمل الروتيني في تقييم الأعلاف . وهذه الطريقة تتم على ثلاث خطوات :

١ ــ هضم بالببسين في حمض هيدروكلوريك على ٤٠° لمدة ٢٤ ساعة .

٢ ـ تحلل مائي للنشا في نفس المحلول على ٨٠°م لمدة ٤٥ دقيقة .

٣ ـ هضم إنزيمي بالسليولاز من Trichoderma viride على ٤٠°م لمدة ٢٤ ساعة .

ويجرى التقدير كالتالي :

١ ـ يذاب ٢ جم ببسين (١ : ١٠٠٠٠) في لتر حمض هيدروكلوريك (٠,١ عياري).

٢ ـ يحضر محلول منظم خلات PH ٤,٨ من :

أ ـ ٥,٩ مل حمض خليك مركزاً في ماء إلى لتر .

ب ـ ١٣,٦ جم خلات صوديوم ثلاثي الماء في ماء إلى لتر .

ويخلط ٤٠٠ مل من (أ) مع ٦٠٠ مل من (ب) وينظم PH فإن زاد يقلل من المحلول (أ) وإن قل PH يزاد المحلول (ب) .

٣ ـ يذاب السليولاز (حسب مصدره) ٣,٣ - ١٣,٥ جم / لتر محلول منظم خلات.

٤ ـ تؤخذ ٠,٣ جم عينة جافة هوائية تمر من منخل ١ م ، ويضاف إليها ٣٠ مل محلول ببسين سبق تسخينه . حضن على ٤٠°م لمدة ٢٤ ساعة ، مع تقليب المحتويات بعد ٥ ساعات .

٥ ـ انقل الأواني إلى حمام ماء على ٨٠°م لمدة ٤٥ دقيقة بالضبط ثم رشح .

٦ ـ يضاف للعينة المتبقية ٣٠ مل محلول سليولاز سبق تسخينه ، ويعاد تحضين الأواني لمدة ٢٤ ساعة على ٤٠°م ، مع تقليبها بعد ٥ ساعات .

٧ ـ المتبقي بعد الترشيح والغسيل يتم تجفيفه ليلة في فرن على ١٠٣°م ، ويوزن ثم يحرق على ٥٥٠°م لمدة ١,٥ ساعة ، ويعاد الوزن .

٨ ـ حاصل الطرح للوزنتين الأخيرتين هو غير المهضوم من المادة العضوية ويعبر عنه كنسبة مئوية تطرح من ١٠٠ للحصول على معامل هضم المادة العضوية بالسليولاز (CDOM) ، وبضرب الأخيرة في محتوى المادة الجافة من مادة عضوية نحصل على المادة العضوية المهضومة بالسليولاز من المادة الجافة Cellulase Digestible Organic Matter in the Dry Matter (CDOMD) .

٩ ـ من معادلات ارتداد يتم التنبؤ بمعاملات الهضم والطاقة الميتابوليزمية والطاقة الصافية لمواد العلف شديدة الشبه بما يمكن الحصول عليه من التجارب البيولوجية على الحيوانات ، حيث إن :

In vivo DOMD = 0.973 CDOMD - 2.49

وهي العلاقة بين المادة العضوية المهضومة من المادة الجافة بيولوجيا (in vivo DOMD) ومعمليا بالسليولاز (CDOMD) ($r^2 = 0.93$) .

$$ME = 0.15\ CDOMD + 0.241\ EE - 0.99\ (r^2 = 0.96)$$

$$NEL = 0.112\ CDOMD + 0.159\ EE - 2.37\ (r^2 = 0.96)$$

$$= 0.118\ CDOMD + 0.5\ GE - 0.02\ CP^2 - 10.41\ (r^2 = 0.95)$$

حيث EE ، CP كنسب مئوية للدهن والبروتين في المادة الجافة ، ME ، NEL ، GE طاقة ميتابوليزمية وصافية وكلية بالميجاچول في الكيلو مادة جافة على الترتيب .

المراجع

- Anok. (1979) Can. J. Anim. Sci. 59 : 631 .
- Chamberlain, D. G. & Thomas, P. C (1983) Anim. Prod., 36 : 155 .
- Close, W. & Menke, K. H. (1986) Selected topics in animal nutrition. Deutsche stiftung fur Internationale Entwicklung, Feldafing, Germany .
- Cottrill, B.R. & Evans, P. J. (1984) A R C Technical Review (Wp / Ra 7 / 0178 / SH) .
- De Boever , J. L. et a . (1986 & 1988) Anim . Feed Sci . Technal., 14 : 203 & 19 : 247 .
- Dowman, M. G. & Collins, F. C. (1982) J. Sci. Food Agric. 33 : 689.
- Mac Rae, J. C. (1974) Proc. Nutr . Soc., 33 : 147 .
- Menke, K. H. & Steingass, H. (1988) Anim. Res. Devlop., 28 : 7 .
- Schneider, B. H& Flatt, W. P . (1975) The evalution of feed through digestibility experiments . The Univ. of Georgia Press .

الفصل الرابع

طرق التحليل البيولوجى للماء

Methods of Biological Analysis of Water

قبل أخذ العينة يجب الوقوف على إجابات بعض الأسئلة التي يجب أن يسألها لنفسه الباحث ، مثلاً : أي الكائنات تعتبر هامة ؟ وهل يتطلب الأمر معلومات كمية أو وصفية كلاهما ؟ متى وأين يجب أخذ العينة ؟ كم عدد العينات الواجب جمعها ؟ ما هي أفضل طرق جمع العينات ؟ كيفية حفظ العينات على ضوء المعلومات المطلوب جمعها من هذه العينات ؟ كيفية عدّ العينة ؟ .

أولا : البلانكتون النباتي Phytoplankton :

جمع العينة :

أكثر طرق جمع العينات انتشارا هي استخدام شبكة البلانكتون Plankton Net ، إلا أنها ذات فائدة محدودة ؛ لأنه يصعب معها تقدير العدّ الكلي ، حجم العينة ، والتركيب النوعي . وشباك البلانكتون عالية الاختيارية ، وثقوبها تستبعد معظم البلانكتون الدقيق الهام غالبا (حتى ٦٥٪ من إجمالي الكتلة) . والطريقة الأفضل هي استخدام أواني العينات بملء أواني بلاستك من عمق ١٠سم تحت السطح . وإذا كان الماء فقير البلانكتون فيؤخذ عينة ٥ لتر ، وإذا كان الماء وفير البلانكتون فتؤخذ العينة بحجم لتر واحد لفحص وعدّ كل الأنواع الشائعة . وهناك أوان لجمع عينات من أعماق مختلفة لدراسة التوزيع الرأسي .

حفظ العينة :

العينات التي ستفحص خلال ساعات قليلة من جمع العينة يجب حفظها باردة (يفضل ثلاجة) ، وإلا فيجب تثبيت وحفظ العينة باستخدام فورمالين ١٠٪ ، أو محلول يود لوجول Lugol's Iodine ، إلا أن الفورمالين يعيبه أنه يؤدي إلى طفو الطحالب الخضراء المزرقة الهشة .

ويتكون محلول يود لوجول من ١٠ جم يود + ٢٠ جم يوديد بوتاسيوم + ٢٠٠ مل ماء مقطرا + ٢٠ جم حامض خليك ثلجيا (يضاف قبل الاستخدام بعدة أيام) في آنية زجاج داكنة . ويضاف للعينة بنسبة ١ : ١٠٠٠ . ويعمل يود لوجول على الترسيب لكن يتلف أو يشوه بعض الطحالب الخضراء .

التقدير:

لفحص البلانكتون النباتي والتعرف عليه وعده ينبغي تركيزها من عينة الماء ، وذلك بالترسيب أو الطرد المركزي أو كليهما . ويتم الترسيب بترك أواني العينات ساكنة ، ثم سحب الرائق بنظرية السيفون لتترك الطحالب مركزة في حجم صغير من العينة (٥-٢٥ مل على حسب عدد الطحالب وطريقة الفحص) . ويمكن طرد العينات مركزيا لمدة ٢٠ دقيقة لسرعة الترسيب إلا أن ذلك يتلف الأنواع الهشة Fragile Species .

التعرف على البلانكتون النباتي وعده يجرى باستخدام ميكروسكوب مركب أو مركب محول ، وأبسط طريقة بوضع نقطة عينة على شريحة ، وتغطيتها بغطاء شريحة وفحصها على القوة الصغرى (٤ × أو ١٠×) ثم القوى الكبرى (٤٠×) للعدسات الشيئية أو الميكروسكوب المركب . ولسوء الحظ فإن تقسيم البلانكتون النباتي معقد جدا لدرجة أنه يصعب غالبا توزيعها على أنواع .

ولعد الطحالب – كذلك – مشاكلها ، فهل يجب عدّ كل الخلايا في المستعمرة ؟ أم يجب فقط تسجيلها كمستعمرة أي كوحدة ؟ فهذا يعتمد على ما إذا كان الواجب تسجيل كثافة الطحالب كخلايا في المليلتر أو كوحدات (مستعمرات) في المليلتر ، والأكثر شيوعا هي الأخيرة ، مع عدم الأخذ في العدد الخلايا الميتة أو المكسرة . وأفضل طرق عدّ الطحالب باستخدام شريحة ميكرومترية ، أي شريحة مزودة بحقل للعد يحجز حجم معلوم من العينة ومنها خلايا Sedgwick - Rafter (S-R) وهي بطول ٥٠ م وعرض ٢٠ م وعمق ١ م وحجمها الكلي ١ مل ، فتملأ الخلية وتغطي لعزل فقاقيع الهواء وتترك ١٥ دقيقة ساكنة لترسيب البلانكتون . احسب عدد الأنواع في ١٠ حقول أو أكثر . استخدم المعادلة التالية :

$$\text{العدد / مل} = \frac{\text{ع} \times 1000}{\text{م} \times \text{ق} \times \text{ح}}$$

حيث ع = العد الكلي للكائنات المعدودة

م = مساحة الحقل م^2

ق = عمق الحقل م

ح = عدد الحقول المعدودة .

ثانيا : البلانكتون الحيواني :

جمع العينة :

هناك مشاكل في الدراسة الكمية للبلانكتون الحيواني ، لتوزيعها الفراغي غير المنتظم

والندرة النسبية للأنواع الأقل انتشارا ، كما أن عديدا من الأنواع لها هجرة رأسية على مدار اليوم . وتفضل أواني العينات سابقة الاستخدام في عينات البلانكتون النباتي وذلك لجمع البلانكتون الحيواني الدقيق Nannozooplankton كالبروتوزوا والقشريات في أطوارها غير الناضجة ، إلا أن البلانكتون الحيواني الأكبر يجمع بشبكة ؛ لأنها يمكن أن تهرب من ممر آخذ العينات . ويتوقف حجم الثقوب وطول الشبكة وطريقة السحب وحجم فوهتها وغيرها على نوع الدراسة المطلوبة . وأفضل مواد الشباك من النيلون الذي لاينكمش بالبلل متجانسة في حجم الثقوب ، ويفضل حجم ثقوبها ٥٠ ميكرومتر للبلانكتون الحيواني الصغير ، بينما شباك ثقوبها ١٢٦ ميكرومتر تكفي للأنواع الأكبر .

وهناك أنواع (Rotifers) لايمكن جمعها كميا بالشباك حتى لو كان حجم ثقوبها ١٠ ميكرومتر . ويمكن أخذ عينة سطحية بسيطة بسحب الشبكة خلف قارب أو جرها عبر حوض ، إلا أن للدراسات الكمية أو التوزيعية ينبغي استعمال طريقة أدق . ويمكن أخذ عينات مجمعة بأخذ سحبة رأسية من القاع للسطح ، فيكفي الماء لترشيحه وجمع الأنواع الأقل شيوعا . وفي أحواض السمك حيث يكون عمقها عادة أقل من ٣م فإنه يفضل أخذ ٥-٦ سحبات Hauls وتجميعها ، مع ارتفاع الشبكة بمعدل ٠,٥ - ١م / ثانية ، ويقدر الحجم المرشح من المعادلة :

ح = ع ط نق^{٢} .

حيث ح = حجم الماء المرشح م^{٣}

ع = عمق عينة الماء (م)

نق = نصف قطر فوهة الشبكة (م)

ط = ٢٢/٧ .

وعادة تؤخذ سحبات أفقية من أعماق مختلفة باستخدام قارب مثبت فيه حاجز معلق فيه شبكة بلانكتون حيواني ذات وزن ، كما تتطلب هذه الطريقة كذلك مقياس زاوية ويقدر العمق للشبكة بضرب طول السلك الممتد في جيب تمام الزاوية Cosine للسلك مع الرأسي وتظل زاوية السلك ثابتة بحفظ سرعة القارب ثابتة .

حفظ العينة :

تحفظ العينة في كحول إيثايل ٧٠٪ ، فورمالين منظم ٥٪ (مع كربونات ماغنسيوم لمعادلة أي حموضة) ، أو محلول يود لوجول . وإذا كانت العينات ستحفظ لفترة طويلة فيضاف ٥٪ جليسرين عادة لمنع البخر .

التقدير :

البلانكتون الحيواني في الماء العذب يتكون أساسا من Rotifers (غالبا صغيرة) ، قشريات Cladoceran Crustaceans (صغيرة إلى كبيرة) ، Ostracods (صغيرة) . بينما البلانكتون الحيواني في البحر متنوع كثيرا ، ويحتوي أشكال يرقية عديدة (Meroplakton) والتي تتطور إلى أشكال بالغة غير بلانكتونية .

البلانكتون الحيواني الدقيق Nannozooplankton بما فيه Rotifers يجب التعرف عليها وعدها أثناء فحص البلانكتون النباتي على شرائح العد . البلانكتون الحيواني الأكبر يفحص تحت ميكروسكوب مركب ويعد في شرائح عد أكبر ، وينسب عدد البلانكتون الكبير لكل متر مكعب من المعادلة :

$$\text{العدد} / م^{٣} = \frac{ع \times ح^{/}}{ح^{//} \times ح^{///}}$$

حيث ع = عدد الكائنات المعدودة

$ح^{/}$ = حجم العينة المركزة (مل)

$ح^{//}$ = الحجم المعدود فيه (مل)

$ح^{///}$ = حجم العينة الصافي المرشح ($م^{٣}$) .

ثالثا : اللافقاريات ساكنة القاع Benthos :

وهي حيوانات ترى بالعين المجردة ، ويجرى فحصها في دراسات مسح عامة ، أو لتقدير إنتاجها ، أو كجزء من دراسة التلوث وكلها تهم علماء الأسماك والاستزراع السمكي . فالمسح يفيد في معرفة ما إذا كان هناك تلوث ما قد حدث في الماضي القريب ، وإذا ما كان الملوث ساما أو عضويا . فالتلوث العضوي يحدد من أعداد الأنواع، بينما الأنواع القليلة التي توجد فتتواجد بأعداد كبيرة جدا . والملوثات السامة تبيد تقريباً كل الحيوانات الموجودة ما عدا الأنواع القليلة عالية المقاومة . فمسح Survey الحيوانات اللافقارية أكثر استخداما عن تحليل عينة ماء ، حيث إن عينة الماء تبرز عينة واحدة فقط أخذت في زمن بسيط معين، ولا تفيد كثيرا فيما حدث من هدم وتأثيرات على مدى بعيد في جودة الماء.

جمع العينات :

العينات الكمية والتعرف على حيواناتها على مستوى الأنواع شيء معقد . تجمع العينات بالكبش Grab والقلب Corer وأخذ عينات من قاع المجرى Stream-Bottom Sampler أو بالشبك . والكباش عبارة عن صندوق بفكين Jaws يرسل للقاع مفتوح الفكين ، ثم يغلق الفكين ميكانيكيا ، ثم يسحب لأعلى . وقد تجر شباك على إطار أبعاده

٣٠×٣٠سم على أن يكون طرف من الإطار على . عـمق ٦سم على الأقل من القـاع فتسحب أى حيوانات موجودة وتغسل داخل الشبكة ، وتستخدم في المياه الضحلة . أما القلابات فتستخدم في الأرض ذات الرواسب الطرية ، وفي مساحات صغيرة ، وتأخذ عيناتها في أنابيب من أعماق أكبر من غيرها .

حفظ العينة :

الأفضل حفظ العينة قبل تصفيتها ؛ لأن ذلك يقلل من خطورة تلف الحيوانات ذات الأجسام الطرية مثل Oligochaetes ، إلا أن ذلك يجعل من الصعب التعرف على الحيوانات الأخرى مثل الديدان Leeches و Turbellarians . وتحفظ العينات في ١٠٪ فورمالين أو ٧٠٪ إيثانول .

الفحص :

تركز اللافقاريات الكبيرة عادة ، وتفرز من الراسب الناعم بنخل العينة برفق خلال منخل قطر ثقوبه ٥٠٠ ميكرومتر . وهذه الأقطار تفقد عديداً من الحيوانات اللافقارية الصغيرة ويرقات Chironomid ؛ لذلك يفضل استخدام منخل قطر ثقوبه ٢٠٠ - ٣٠٠ ميكرومتر ، وإن كان ذلك يأخذ وقتاً أطول . وتفرز الحيوانات باستخدام ميكروسكوب مجسم Stereoscopic Microscope . وللتعرف على مستوى الأنواع فمن الضروري التعرف على أجزاء الفم ، أو تعد الحيوانات على شرائح باستخدام بولي فينيل لاكتوفينول والفحص تحت القوى الكبرى .

المراجع :

- Bogd, C.E.(1981) Water Quality in Warmwater Fish Ponds Auburn Univ. , Alabama .
- Carlbery , S. (1967) FAO Fish. Tech .Pap. NO 137 .
- Harris L.E (1985) in : Fish Feed Technology Reprent Aquaculture Development and Coordination Programme ADCP / REP / 80 / 11, FAO Rome pp: 141 - 142 .
- Laevastu . T. (1965) FAO Manuals in Fish. Sci No.1, Fascicule 1&9, FAO Rome .
- Stirling, H.P. (1985) Chemical and biological Methods of Water

analysis for aquaculturalists. Institute of Aquaculture , Univ . of Stirling , Scotland .

- Woyewode . A.D. et al . (1986) Can .Tech . Rep Fish & Aquatic Sci. No . 1448 .


ملاحـــق

١ ـ تنظيف الأدوات الزجاجية

يعتبر تنظيف الأدوات الزجاجية بالغ الأهمية في التقديرات الكيماوية الكمية ، وكذا في الميكروبيولوجي وعموما في الميكروتكنيك .

فتستخدم محاليل تنظيف متعددة في أغراض تنظيف مختلفة وأهمها ما يلي :

أ ـ محلول حامض الكبريتيك والكرومات :

وهو أكثر المحاليل المعروفة انتشاراً ويتركب من :

بيكرومات بوتاسيوم (أو صوديوم) ٢٠ – ٤٠ جم

ماء ٧٥ – ١٥٠ مل

حامض كبريتيك مركز ١١٥ – ٢٣٠ مل .

يذاب ملح البيكرومات في الماء في كأس بيركس سعة لتر ، ثم يضاف الحامض بكميات قليلة مع ترك المحلول ليبرد من حين لآخر ، ثم يحفظ هذا المحلول في حوض زجاجي متسع ذي غطاء زجاجي غير محكم . يكرر استعمال هذا المحلول إما بالنقع فيه ، أو بملء الأواني الملوثة به حتى يصبح لونه داكنا . ويجب غسل الأواني من الكحول قبل نقعها فيه . لأن تلوث هذا المحلول المنظف بقليل من الكحول يضعف قوته المؤكسدة ويصبح عديم الفاعلية . عقب نقع الأدوات في هذا المحلول عدة ساعات (يفضل تركها طوال الليل) ثم تشطف جيدا بالماء الجاري ثم بالماء المقطر .

ب ـ محلول حامض الكبريتيك والنيتريك :

يستعمل هذا المحلول في الأدوات شديدة التلوث ، ويحضر بالنسب الآتية :

حامض كبريتيك مركز ١٠ مل

حامض نيتريك مدخن ٣٠ مل .

تنقع الأدوات الزجاجية في هذا المزيج عدة ساعات ، ثم تشطف في الماء العادي ثم بالماء المقطر . ويجب حفظ هذا المحلول في زجاجات بنية محكمة ذات غطاء زجاجي ؛ لأنه يتفاعل بشدة ويتلف سدادات الفلين والمطاط .

جـ ـ محلول حامض النيتريك والهيدروكلوريك :

يعاب على هذا المحلول عدم ثباته ، كما تتصاعد الأبخرة المهيجة من هذا المحلول على الدوام ، ويحضر بالنسب الآتية :

حامض نيتريك مركز ١٠ مل

حامض هيدروكلوريك مركز ٤٠ مل .

تنقع به الأدوات الزجاجية عدة ساعات ، ثم تغسل بالماء الجاري وتشطف فى النهاية بالماء المقطر .

د ـ محلول حامض الكروميك (طريقة أخرى للتحضير) :

يستعمل محلول مركز من حامض الكروميك كما يلى :

حامض كروميك ٥٠ مل (١٠جم ثانى/كرومات بوتاسيوم / ١٠٠مل يدم كب أ٤)

ماء ١٠٠ مل .

ويستعمل هذا المحلول في النقع طوال الليل ، أو يصب فى الأوانى التي نعاني مشقة تنظيفها ، ثم تشطف جيدا بالماء العادي ثم بقليل من الماء المضاف إليه الأمونيا لضمان التخلص من آثار الكروميك ، ثم تشطف بالماء المقطر . احذر من ملامسة هذا الحامض للجلد أو الملابس ؛ لأنه يتلفها فورا.

هـ ـ محلول الكحول الحامضى :

يعتبر هذا المزيج من أفضل المحاليل لتنظيف الأوعية والأحواض ذات المخلفات الكحولية، ويجرى/ تحضيره/ كالتالى :

كحول إيثايل ٩ مل

حامض هيدروكلوريك مركز ١ مل .

تشطف به الأوانى فينظفها فورا . تغسل بالماء المضاف إليه قليل من هيدروكسيد النشادر ثم تغسل بالماء المقطر .

و ـ محلول الصابون :

لا ينصح الكثيرون باستخدام الصابون فقط كوسيلة للتنظيف ؛ خصوصاً لأنه يترك أثرا دهنيا على الأواني . ويفضل اتباع النظام التالي :

يملأ الوعاء أو تنقع الأدوات في محلول الصابون الدافئ ويترك لمدة لا تقل عن ١٥ دقيقة ، ثم تغسل بالماء الجاري ، أو يغير الماء عدة مرات ، ثم تعامل بكمية من حامض الهيدروكلوريك ، أو بمزيج الهيدروكلوريك والنيتريك ، ثم بالماء المضاف إليه قليل من الأمونيا ، ثم بالماء الجاري ، ثم تشطف في النهاية بالماء المقطر .

ز ـ الزيلول والبنزين :

يستعمل كل منهما على حدة أو كمزيج منهما . والهدف الرئيسى من استعمالهما هو إذابة المواد الدهنية والشمع .

ولتنظيف الزجاجيات الجديدة التى لم تستعمل قبل فتغسل بحامض هيدروكلوريك ساخن ، ثم عدة مرات بالماء المقطر مع استعمال التفريغ Vacuum فى حالة المرشحات .

وتتوقف أنواع المنظفات على الشوائب الموجودة ، وفيما يلى بعض الأمثلة :

المادة المراد تنظيفها	وسيلة التنظيف
كبريتات باريوم	حمض كبريتيك مركز ساخن ١٠٠° م
كلوريد فضة	محلول أمونيا ساخن
أوكسيد نحاسى أحمر	حمض هيدروكلوريك ساخن وكلورات بوتاسيوم
مخلفات الزئبق	حمض نيتريك مركز ساخن
كبريتيد زئبق	ماء ملكى ساخن
البيومين	محلول أمونيا ساخن أو حمض هيدروكلوريك
الشحم أو الزيت	رابع كلوريد الكربون
المواد العضوية الأخرى	حمض كبريتيك مركز ساخن مع إضافة حمض نيتريك أو نيترات صوديوم أو ثانى كرومات بوتاسيوم
فحم حيوانى	تسخين (بحرص) مع خليط من ٥ حجوم حمض كبريتيك مركز مع ١ حجم حمض نيتريك مركز على حوالى ٢٠٠° م

ثم اسكب المنظف واغسل بالماء .

ولا يفضل استعمال حمض الفوسفوريك المركز الساخن ، أو القلوي الساخن ؛ لأنها تضر بمسطحات الزجاج .

٢ ـ بعض المعلومات الأساسية في الكيمياء التحليلية

المول Mole هو الوزن الجزيئى بالجرام .

الكمية بالمول هى الوزن بالجرام / على الوزن الجزيئى .

المولر Molarity (M) هو التركيز بالمول / لتر ، أو الكمية المذابة بالمول/الحجم باللترات.

وزن المادة المذابة بالجرام فى محلول معلوم العيارية Mormality (N) : هو حاصل ضرب ١ جم المحلول باللتر × عيارية المحلول × وزنه المكافئ .

تحضر المحاليل المخففة طبقا للقاعدة التى تنص على أن :

حاصل ضرب الحجم × التركيز (قبل التخفيف)= الحجم × التركيز (بعد التخفيف).

عدد المكافئات هو حاصل ضرب الحجم × العيارية .

النسب المئوية تعتبر نسبا وزنية ما لم ينص على أنها حجمية .

كمية المذاب بالملليمول فى حجم ما = الحجم بالملليلتر × التركيز المولر .

التركيز العيارى = كمية المذاب بالمكافئات / حجم المحلول باللتر .

١ جم ذرة (جرام ـ وزن ذري Gram Atomic Weight) = الوزن الذري للعنصر معبرا عنه بالجرام = ١٠٠٠ ملليجرام- ذرة Milligram Atom .

١ جم ـ جزىء (١ مول Mole)= الوزن الجزيئي بالجرام لأي مركب= ١٠٠٠ ملليمول .

الكمية بالمول لمذاب = وزن المركب المذاب جم / وزنه الجزيئى جم .

الكمية المذابة جم = الكمية بالمول × الوزن الجزيئى جم .

١ ملليمول = ٠,٠٠١ مول = الوزن الجزيئى جم × ٠,٠٠١ .

٪ للعنصر فى المركب = ١٠٠ × وزن العنصر (بالوزن الجزيئي للمركب) جم / الوزن الجزيئي جم .

الوزن المكافئ = الوزن الجزيئي / التكافؤ .

كل محلول مكون من مذيب Solvent ومذاب Solute ، والأول تركيزه عال نسبيا عن تركيز الآخر . ويعبر عن التركيز بأحد نظامين :

أ ـ أوزان نسبية للمذاب والمذيب ، كالنسب المئوية باختلاف أنواعها والتركيز المولل Molal، والكسر المولى mole fraction .

ب ـ وزن المذاب في وحدة الحجم من المحلول كالجرام في وحدة الحجم ، والتركيز المولر Molar ، والتركيز العياري Normal .

وفيما يلى وصف مبسط لبعض مفردات النظامين المذكورين :

١ ـ الجرام في وحدة الحجم كتحضير محلول Na Cl تركيز ٥ جم / لتر ، بإذابة ٥ جم من الملح النقى فى قليل من الماء ، ثم التخفيف بالماء حتى يكتمل الحجم الكلى للمحلول إلى لتر (وليس بإضافة لتر ماء إلى ٥ جم ملح) .

٢ ـ النسبة المئوية وقد تكون وزن / وزن ($\frac{\text{وزن المذاب جم}}{\text{وزن المحلول جم}} \times ١٠٠$) ، أو حجم / حجم ($\frac{\text{حجم المذاب مل}}{\text{حجم المحلول مل}} \times ١٠٠$) ، أو وزن / حجم ($\frac{\text{وزن المذاب جم}}{\text{حجم المحلول مل}} \times ١٠٠$) ، أو حجم وزن ($\frac{\text{حجم المذاب مل}}{\text{وزن المحلول جم}} \times ١٠٠$) .وفي التركيزات البسيطة يعبر عنها كجزء في الألف، أو في المليون بدلاً من جزء في المائة .

٣ ـ النسب الحجمية تستعمل في التحليل الوصفي لتحضير محاليل تركيزها تقريبي ، كتحضير محلول حمض HCl ١ : ٣ ، أي بإضافة حجم من الحامض المركز إلى ٣ حجوم من الماء .

٤ ـ الكسر المولي لمحلول مكون من أكثر من مكون ، فتنسب كمية مادة ما بالمحلول بالمول إلى المجموع الكلى بالمول لمكونات المحلول المختلفة ، فمثلا إذا احتوى محلول على مادتين أ ، ب بتركيز ٣ ، ٥ مول لكلاهما على الترتيب ، فيكون الكسر المولي للمادة = ٣ / ٨ = ٠,٣٧٥ ، والكسر المولى للمادة ب = ٥ / ٨ = ٠,٦٢٥ ، ومجموعهما مساوياً الواحد الصحيح دائما .

٥ ـ التركيز المولر أي كمية المذاب بالمول في لتر واحد من المحلول ، فالمحلول الذي تركيزه ١ مولر ؛ عبارة عن محلول يحتوي اللتر منه على ١ مول مذاب، أى ١ جم – جزىء (علما بأن إذابة ١ مول فى لتر لا تعطى محلولاً تركيزه ١ مولر ؛ لأن حجم المحلول الناتج لا تساوي لترا واحدا) . والتركيز المولر كذلك هو الذي يحتوي محلوله على ملليمول واحد / ملليلتر منه (لأن المول = ١٠٠٠ ملليمول) .

∴ التركيز المولر = الكمية بالمول / حجم المحلول باللتر .

= الكمية بالملليمول / حجم المحلول بالملليلتر .

٦ ـ التركيز المولل لمحلول هو احتواؤه على مول واحد مادة مذابة في كيلوجرام واحد مذيب فالمحلول ١ مولل من حمض الكبريتيك عبارة عن ٩٨,٠٨ جم حمض + ١٠٠٠ جم ماء .

٧ ـ التركيز العيارى وهو الأهم في جميع العمليات الحسابية فى التفاعلات الكيميائية التحليلية الكمية. والتركيز العياري عبارة عن الوزن المكافىء (جم-مكافىء) في اللتر، وهو شبيه بالتركيز المولر فيما عدا أن فى المولر يستخدم جم-جزىء (أي مول في اللتر

بدلاً من جم-مكافئ (في التركيز العيارى) . أى أن المحلول العيارى (١ ع) يحتوى اللتر منه على مكافئ واحد (١ جم-مكافئ) من المادة المذابة ، أو أن الملليلتر منه يحتوى على ملليمكافئ واحد .

وفيما يلى بعض المجاميع الهامة الشائعة :

١ - مجاميع أحادية التكافؤ Univalent groups **ومنها على سبيل المثال: النترات** NO_3' ، نيتريت NO_2' ، هيدروكسيل OH' ، **برمنجنات** $Mn\,O_4'$ ، **كلورات** CLO_3' ، **خلات** CH_3' ، بيكربونات HCO_3' ، **كلوريت** CLO_2' ، **سيانيد** CN' ، **فورمات** $HCOO'$ ، COo' ، ثيوسلفات $S_2\,O_3'$ ، فوق كلورات (Perchlorate) CLO_4' ، **أيودات** IO_3' ، **هيبوكلوريت** clO' ، وتنتمى لهذه المجموعة بعض **الأحماض كالنيتريك** HNO_3 ، **النيتروز** HNO_2 ، الكلوريك $HClO_3$ ، البرمنجنيك $HMn\,O_4$.

٢ - مجاميع ثنائية التكافؤ Bivalent Groups **ومنها : ومنها الكرومات** $Cr\,O_4''$ ، **كبريتيت** SO_3 ، كبريتات SO_4'' ، كربونات CO_3'' ، **نحاسيك نشادرى** $Cu\,(NH_3)_4^{++}$ ، **بيكرومات** $Cr_2\,O_7''$ ، بورات $B_4\,O_7''$ ، سليكات $Si\,O_3''$ ، **إكسالات** $C_2\,O_4''$ ، **بالإضافة للأحماض مثل** الكبريتوز $H_2\,SO_3$ ، الكبريتيك $H_2\,SO_4$ ، **الكربونيك** $H_2\,CO_3$ ، **الكروميك** $H_2\,Cr\,O_4$.

٣ - مجاميع ثلاثية التكافؤ Tervalent Groups **مثل : الفوسفات** PO_4''' ، **فسفيت** PO_3''' ، زرنيخات $As\,O_4'''$ ، زرنيخيت $As\,O_3'''$ ، **حديدوسيانور** $Fe\,(CN)_6'''$ ، **بالإضافة للأحماض** التى منها الفوسفوروز $H_3\,PO_3$ ، الفوسفوريك $H_3\,PO_4$ ، **الزرنيخوز** $H_3\,As\,O_3$ ، الزرنيخيك $H_3\,A_sO_4$ ، البوريك $H_3\,BO_3$.

العناصر الكيماوية ورموزها وترتيبها ووزنها الذرى

العنصر		الرمز الكيماوى	ترتيبه فى الجدول الدورى	الوزن الذرى
أكتينيوم	*Actinium*	*Ac*	٨٩	٢٢٧,٠٥
ألومنيوم	*Aluminium*	*Al*	١٣	٢٦,٩٧
أنتيمون	*Antimony*	*Sb*	٥١	١٢١,٧٦
أرجون	*Argon*	*Ar*	١٨	٣٩,٩٤٤
زرنيخ	*Arsenic*	*As*	٣٣	٧٤,٩١
باريوم	*Barium*	*Ba*	٥٦	١٣٧,٣٦
بريلليون	*Beryllium*	*Be*	٤	٩,٠١٣
رصاص	*(Blei) Lead*	*Pb*	٨٢	٢٠٧,٢١
بورون	*Boron*	*B*	٥	١٠,٨٢
بروم	*Bromine*	*Br*	٣٥	٧٩,٩١٦

العنصر		الرمز الكيماوى	ترتيبه فى الجدول الدورى	الوزن الذرى
كادميوم	*Cadmium*	*Cd*	٤٨	١١٢,٤١
كلور	*Chlorine*	*Cl*	١٧	٣٥,٤٥٧
كروم	*Chromium*	*Cr*	٢٤	٥٢,٠١
ديبروسيوم	*Dypresium*	*Dy*	٦٦	١٦٢,٤٦
حديد	*(Eisen) Iron*	*Fe*	٢٦	٥٥,٨٥
أربيوم	*Erbium*	*Er*	٦٨	١٦٧,٢
أيوروبيوم	*Europium*	*Eu*	٦٣	١٥٢,٠
فلور	*Fluorine*	*F*	٩	١٩,٠٠
جادولينيوم	*Gadolinium*	*Gd*	٦٤	١٥٦,٩
جالليوم	*Gallium*	*Ga*	٣١	٦٩,٧٢
جيرمانيوم	*Germanium*	*Ge*	٣٢	٧٢,٦٠
ذهب	*Gold*	*Au*	٧٩	١٩٧,٠
هافنيوم	*Hafnium*	*Hf*	٧٢	١٧٨,٦
هليوم	*Helium*	*He*	٢	٤,٠٠٣
هولميوم	*Holmium*	*Ho*	٦٧	١٦٤,٩٤
إنديوم	*Indium*	*In*	٤٩	١١٤,٧٦
إريديوم	*Iridium*	*Ir*	٧٧	١٩٢,٢
يود	*Iodine*	*I*	٥٣	١٢٦,٩٢
بوتاسيوم	*(Kalilum) Potassium*	*K*	١٩	٣٩,٠٩٦
كالسيوم	*(Kalzium) Calcium*	*Ca*	٢٠	٤٠,٠٨
كاسيوبيوم	*(Cassiopeium)Lutecium*	*Lu (CP)*	٧١	١٧٤,٩٩
كوبلت	*(Kobalt) Cobalt*	*Co*	٢٧	٥٨,٥٤
كربون	*(Kohlen Stoff) Carbon*	*C*	٦	١٢,٠١١
كريبتون	*Krypton*	*Kr*	٣٦	٨٣,٧
نحاس	*(Kopfer) Copper*	*Cu*	٢٩	٦٣,٥٧
لانثانم	*Lanthanum*	*La*	٥٧	١٣٨,٩٢
ليثيوم	*Lithium*	*Li*	٣	٦,٩٤
ماغنسيوم	*Magnesium*	*Mg*	١٢	٢٤,٣٢
منجنيز	*Manganese*	*Mn*	٢٥	٥٤,٩٤
موليبدنم	*Molybdenum*	*Mo*	٤٢	٩٥,٩٥
صوديوم	*(Natrium) Sodium*	*Na*	١١	٢٢,٩٩١
نيوديميوم	*Neodymium*	*Nd*	٦٠	١٤٤,٢٧

العنصر		الرمز الكيماوى	ترتيبه فى الجدول الدورى	الوزن الذرى
نيون	*Neon*	*Ne*	١٠	٢٠,١٨٣
نيكل	*Nickel*	*Ni*	٢٨	٥٨,٦٩
كولومبيوم	Columbium *(Niobium)*	*Nb*	٤١	٩٢,٩١
أوسميوم	*Osmium*	*Os*	٧٦	١٩٠,٢
بالاديوم	*Palladium*	*Pd*	٤٦	١٠٦,٧
فوسفور	*Phosphorus*	*P*	١٥	٣٠,٩٤
بلاتين	*Platinium*	*Pt*	٧٨	١٩٥,٢٣
بلوتونيوم	*Plutonium*	*Pu*	٩٤	٢٣٩,٠٠
براسيوديميوم	*Praseodymium*	*Pr*	٥٩	١٤٠,٩٢
زئبق	*(QUecksilber) Mercury*	*Hg*	٨٠	٢٠٠,٦١
راديوم	*Radium*	*Ra*	٨٨	٢٢٦,٠٥
رادون	(Niton) *Radon*	*Rn*	٨٦	٢٢٢,٠٤
رينيوم	*Rhenium*	*Re*	٧٥	١٨٦,٣١
روديوم	*Rhodium*	*Rh*	٤٥	١٠٢,٩١
روبيديوم	*Rubidium*	*Rb*	٣٧	٨٥,٤٨
روثينيوم	*Ruthenium*	*Ru*	٤٤	١٠١,١
ساماريوم	*Samarium*	*Sm*	٦٢	١٥٠,٤٣
أوكسجين	*Oxygen (Sauerstoff)*	*O*	٨	١٦,٠٠
كبريت	*Sulphur*	*S*	١٦	٣٢,٠٦
سيلينيوم	*Selenium*	*Se*	٣٤	٨٧,٦٣
فضة	*Silver*	*Ag*	٤٧	١٠٧,٨٨
سليكون	*Silicon*	*Si*	١٤	٢٨,٠٦
سكانديوم	*Scandium*	*Sc*	٢١	٤٥,١٠
نيتروجين	*Nitrogen (Stickstoff)*	*N*	٧	١٤,٠٠٨
سترانشيوم	*Strontium*	*Sr*	٣٨	٨٧,٦٣
تانتاليم	*Tantalum*	*Ta*	٧٣	١٨٠,٩٥
تللوريوم	*Tellurium*	*Te*	٥٢	١٢٧,٦١
تربيوم	*Terbium*	*Tb*	٦٥	١٥٨,٩٣

العنصر		الرمز الكيماوى	ترتيبه فى الجدول الدورى	الوزن الذرى
ثاليوم	*Thallium*	*Tl*	٨١	٢٠٤,٣٩
ثوريوم	*Thorium*	*Th*	٩٠	٢٣٢,٠٥
ثوليوم	*Thulium*	*Tm*	٦٩	١٦٨,٩٤
تيتانيوم	*Titanium*	*Ti*	٢٢	٤٧,٩٠
يورانيوم	*Uranium*	*U*	٩٢	٢٣٨,٠٧
ڤاناديوم	*Vanadnium*	*V*	٢٣	٥٠,٩٥
هيدروجين	*(Wasserstoff) Hydrogen*	*H*	١	١,٠٠٨
بزموت	*(Wismut) Bismuth*	*Bi*	٨٣	٢٠٩,٠٠
تنجستن	*(Wolfcam) Tungsten*	*W*	٧٤	١٨٣,٩٢
زينون	*Xenon*	*X*	٥٤	١٣١,٣
يتربيوم	*Ytterbium*	*Yb*	٧٠	١٧٣,٠٤
يتريوم	*Yttrium*	*Y*	٣٩	٨٨,٩٢
زير	*Zer*	*Ce*	٥٨	١٤٠,١٣
زنك	*Zinc*	*Zn*	٣٠	٦٥,٣٨
قصدير	*(Zinn) Tin*	*Sn*	٥٠	١١٨,٧٠
زيركونيوم	*Zirconium*	*Zr*	٤٠	٩١,٢٢

التركيب الكيماوى لبعض المركبات

Ferrous ammonium sulphate كبريتات أمونيوم حديدوز	$FeSO_4(NH_4)_2SO_4.6H_2O$
Oxalic acid حمض أوكساليك	$(COOH)_2.2H_2O$
Silver nitrate نترات فضة	$AgNO_3$
Potassium hydrogen phthalate فثالات بوتاسيوم	$COOH.C_6H_4COOk\ (KHC_8H_4O_4)$
Antimony potassium tartrate طرطرات بوتاسيوم أنتيمونى	$KSbOC_4H_4O_6$

Sodium tetraborate (Borax) بوراكس	Na_2B_4O7
Stannous chloride كلوريد قصديروز	$Sn\ cl_2\ 2H_2O$
Sodium carbonate كربونات صوديوم	$Na_2\ cO_3$
Potassium diiodate ثانى يودات بوتاسيوم	$KH\ (I\ o_3)_2$
Potassium dicromate ثانى كرومات بوتاسيوم	$K_2\ Cr\ _2\ O_7$
Potassium Bromate برومات بوتاسيوم	$K\ Br\ O_3$
Potassium iodate يودات بوتاسيوم	$K\ I\ o_3$
Sodium Oxalate أوكسالات صوديوم	$Na_2\ C_2\ 0_4$
Sodiua thiosulfate ثيوكبريتات صوديوم	$Na_2\ S_20_3\ 5H_20$
chloroform كلورفورم	$CHCl_3$
Methanol ميثانول	CH_3OH
Acetonitril إسيتونيتريل	CH_3CN
Formic acid حمض فورميك	$H\ .\ COOH$
Acetic acid حمض خليك	$CH_3\ COOH$

التركيب الكيماوى لبعض المركبات

Propionic acid	حمض بروبيونيك	$C_2H_5 . COOH$
Butric acid	حمض بيوتريك	$C_3H_7 . COOH$
Lactic acid	حمض لاكتيك	$C_2H5O . CooH$
Aceten	اسيتون	$CH_3 . CO.CH_3$
Acetaldehyde	استيالدهيد	$CH_3 . CHO$
Formaldehyde	فورمالدهيد	$H. CHO$

الدلائل Indicators

اسم الدليل	مدى عمله (PH)	تغيير اللون	تحضيره
أزرق ثيمول حامض	١,٢ ـ ٢,٨	أحمر إلى أصفر	٠,١ جم + ٤,٣ مل ٠,٠٥ ع ص أ يد / ٢٥٠ مل ماء.
برتقالى مثيل	٣,٠ ـ ٤,٤	أحمر إلى أصفر	٠,١ جم / ١٠٠ مل مـــاء ساخن .
أخضر بروموكريزول	٣,٨ ـ ٥,٤	أصفر إلى أخضر	٠,١ جم + ٢,٩ مل ٠,٠٥ ع ص أ يد / ٢٥٠ مل ماء.
أحمر مثيل	٤,٤ ـ ٦,٢	أحمر إلى أصفر	٠,٠٥ ـ٠,٢ جـــم / ١٠٠ مل ٥٠ ٪ كحول .

الدلائل *Indicators*

اسم الدليل	مدى عمله (PH)	تغيير اللون	تحضيره
أحمر فينول	٦,٨ ـ ٨,٤	أصفر إلى أحمر	٠,١ جم + ٥,٧ مل ٠,٠٥ ع ص أ يد / ٢٥٠ مل ماء.
أزرق ثيمول قاعدى	٨,٠ ـ ٩,٦	أصفر إلى أزرق	كما ذكر أعلى .
فينولفثالين	٨,٣ ـ ١٠,٠	عديم اللون إلى أحمر	٠,١ ـ ١ ٪ فى ٥٠ ٪ كحول .

لعمل محاليل دلائل أقوى تذاب الدلائل فى ١٠٠ مل بدلا من ٢٥٠ مل . يختلف المدى الذى يعمل فيه الدليل بزيادة تركيز الدليل ، أو بارتفاع الحرارة ، أو باستخدامه فى أوساط غير مائية ، وبتأثير ثانى أوكسيد الكربون فى المحلول .

مواصفات بعض القلويات والأحماض :

المركب	الكثافة ٢٠ ـ ٤٠ْ	التركيز ٪	القوة بالأساسى (ع)
هيدروكسيد أمونيوم	٠,٩٠	٢٨,٠	١٥,١
هيدروكسيد صوديوم	١,٥٠	٥٠,٠	١٩,٠
حامض / كبريتيك مركز	١,٨٤	٩٦ (٩٥ـ٩٧)	٣٥,٩ (٣٦)
حامض / كبريتيك مدخن	١,٩٩		
حامض نيتريك مركز	١,٤٢ (١,٤٠)	٦٩,٥ (٦٥)	١٥,٦ (١٤)
حامض هيدروكلوريك مركز	١,١٨ (١,١٦)	٣٦,٠ (٣٢)	١٠,٠ (١٢)
حامض هيدروكلوريك مدخن	١,١٩	٣٨	١٢,٥
حامض فوسفوريك	١,٧٥ (١,٦٩)	٨٩ (٨٥)	٤٨ (٤٥)

مواصفات بعض القلويات والأحماض

المركب	الكثافة ٢٠-٤٠	التركيز ٪	القوة بالأساسى (ع)
حامض خليك ثلجى	١,٠٦	٩٦ ـ ١٠٠	١٧ ـ ١٨
حامض فورميك	١,٢٢	٩٨ ـ ١٠٠	٢٦

نقطة غليان الماء على الارتفاعات المختلفة :

تختلف درجة الحرارة التى تغلى عندها المياه وذلك بالاختلاف عن سطح البحر ، كما توضحه البيانات التالية :

الارتفاع بالقدم	نقطة الغليان	
	درجة فهرنهيت	درجة مئوية
صفر	٢١٢,٥	١٠٠,٠
٥٠٠	٢١١,٢	٩٩,٦
١٠٠٠	٢١٠,٢	٩٩,٠
١٥٠٠	٢٠٩,٢	٩٨,٤
٢٠٠٠	٢٠٨,٣	٩٧,٩
٢٥٠٠	٢٠٧,٤	٩٧,٤
٣٠٠٠	٢٠٦,٤	٩٦,٩
٤٥٠٠	٢٠٣,٦	٩٥,٣
٥٠٠٠	٢٠٢,٦	٩٤,٨
٥٥٠٠	٢٠١,٧	٩٤,٣
٦٠٠٠	٢٠٠,٧	٩٣,٧
٦٥٠٠	١٩٩,٨	٩٣,٢
٧٠٠٠	١٩٨,٨	٩٢,٧
٧٥٠٠	١٩٧,٩	٩٢,٢

درجة غليان (Boiling Point) بعض المذيبات والكيماويات

المذيب	درجة الغليان
إثير إثيلي	٣٥° م .
إثير بترولي	أقل من ٤٠° ـ ٤٠° إلى ٦٠° ـ ٥٠° إلى ٦٠° ـ ٦٠° إلى ٨٠° ـ ٨٠° إلى ١٠٠° ـ ١٠٠° إلى ١٢٠° ـ فوق ١٢٠°م .
أسيتون	٥٦,٥° م .
كلوروفورم	٦١,٢° م .
ميثانول	٦٤,٧° م .
خلات إثيل	٧٧° م .
رباعي كلوريد الكربون	٧٨° م .
إيثانول	٧٨,٣° م .
بنزين	٨٠° م .
إيزوبيوتانول	١٠٦° م .
تلوين	١١١° م .
بيريدين	١١٥° م .
ن – بيوتانول	١١٧° م .
حامض خليك ثلجي	١١٩° م .
كحول إيزواميل	١٣١° م .
جلسرين	٢٩٠° م .
حامض كبريتيك	٣٣٨° م .
زئبق	٣٥٧° م .

تأثير الظروف البيئية على بعض الخواص الطبيعية :

تختلف درجة حرارة التجمد باختلاف الملوحة كالتالى :

٪ للأملاح	درجة حرارة التجمد ف°	درجة حرارة التجمد °م
٥	٢٥,٢	– ٣,٨
١٠	١٨,٧	– ٧,٤
١٥	١٢,٢	– ١١,٠
٢٠	٦,١	–١٤,٤
٢٥	٠,٥	– ١٧,٥

مخاليط التبريد

المخلوط *	الانخفاض فى درجة حرارة °م	
	من	إلى
٤ ماء + ١ كلوريد بوتاسيوم	+ ١٠	– ١٢
١ ماء + ١ نيترات أمونيوم	+ ١٠	– ١٥
١ ماء + ١ نيترات صوديوم + ١ كلوريد أمونيوم	+ ٨	– ٢٤
٣ مطحون ثلج + ١ كلوريد صوديوم	صفر	– ٢١
١,٢ مطحون ثلج + ٢ كلوريد كالسيوم (سداسى الماء)	صفر	– ٣٩
ميثانول أو أسيتون + حمص	صفر	– ٥٥
كربونات جاف	+ ١٥	– ٧٧

* الأرقام تشير إلى أجزاء وزنية .

ويختلف ضغط بخار الماء المشبع باختلاف درجات الحرارة كالتالى :

درجة الحرارة °م	الضغط مـم زئبق
١٠	٩,٢٠
١٥	١٢,٧٧
٢٠	١٧,٥١
٢٥	٢٣,٧٨
٣٠	٣١,٧٩
٣٥	٤٢,١٤
٤٠	٥٥,٢٩
٤٥	٧١,٨٤

إنتاج رطوبة جوية ثابتة فى أوان مغلقة :

محاليل مشبعة من	الرطوبة النسبية أعلى المحلول ٪ على ٢٠°
كربونات صوديوم (١٠ ماء)	٩٢
كبريتات أمونيوم	٨٠
كلوريد بوتاسيوم	٨٦
كلوريد صوديوم	٧٦
نيترات أمونيوم	٦٣
نيترات كالسيوم (٤ ماء)	٥٥
كربونات بوتاسيوم (ماء)	٥٤
كلوريد كالسيوم (٦ ماء)	٣٥

درجة انصهار Melting Point بعض الكيماويات :

العنصر	درجة غليانه	العنصر	درجة غيانه
بنزول	٥,٥° م	ألومنيوم	٦٥٩,٨° م
حمض خليك	١٦,٦° م	فضة	٩٦٠,٥° م
برافين	٤٦° م	ذهب	١٠٦٣° م
بوتاسيوم	٦٢° م	نحاس	١٠٨٣° م
صوديوم	٩٧° م	حديد زهر	١١٤٥° م
كبريت	١١٣° م	منجنيز	١٢٤٧° م
قصدير	٢٣٢° م	حديد صب	١١٠٠ــ١٣٠٠° م
كادميوم	٣٢١° م	صلب	١٤٠٠° م
رصاص	٣٢٧° م	نيكل	١٤٥٥° م
زنك	٤١٩,٤° م	كوبلت	١٤٩٠° م
ماغنسيوم	٦٥٧° م	بلاتين	١٧٧٤° م
		تنجستن	٣٣٨٠° م

الحجوم :

إن الطن المترى من السلع المختلفة يشغل حجما متغايرا :

السلعة بالطن	حجم الطن بالمتر المكعب
الفحم النباتى	٤,٥ – ٦,٧٠
الفحم الحجرى	١,١٥ ــ ١,٣٠
حديد خام	٠,٢٧٠
شعير	١,٦٧
شوفان	٢,١٣
دريس (بالات)	٣,٦٠ ــ ٦,٠٠
قش (غير مضغوط)	٢٢,٠٠
قش (مضغوط)	٣,٦٠
قمح	١,٢٥

السلعة بالطن	الحجم بالمتر المكعب
حنطة	١,٣٩
بنجر	١,٥٥ ـ ١,٧٥
بطاطس	١,٤٠
سماد سوبر فوسفات	١,٢٥
سماد نترات (أكياس)	٠,٩٠ ـ ١,١٠
جير (مطفى)	٠,٧٧ ـ ,٨٤
حجر جيرى	٠,٥٠ .
رمل (رطب)	٠,٥٠ .
رمل (جاف)	٠,٦٥ .
ملح (فى أكياس)	١,٦٠
صلب	٠,١٢
قطران (رطب)	٠,٥٠ .
قطران (جاف)	٠,٥٦ .
صوف (مفكوك)	٢,٢٢
صوف (مضغوط)	٠,٧٥
أسمنت (أكياس)	١,٠٠ ـ ١,٢٠
طوب	٦٥ ـ ٠,٧٥

الكثافة أو الوزن النوعى *Specific Gravity* :

هل تعلم أن كثافة الماء المقطر تساوى الوحدة ، وأن ما كانت كثافته أقل من الواحد [كحول ـ بنزين ـ زبد ـ ثلج ـ فحم نباتى ـ بوتاسيوم ـ صوديوم ـ كاوتشوك ـ فلين ـ فحم الكوك ـ جلد ـ زيت ـ بارفين ـ شمع ......] فإنه يطفو على الماء وما كانت كثافته أكبر من الواحد [ألمونيوم ـ أنتيمون ـ زرنيخ ـ باريوم ـ رصاص ـ بروم ـ برونز ـ كالسيوم ـ كروم ـ حديد ـ زجاج ـ ذهب ـ جرافيت ـ صمغ ـ يود ـ ملح طعام ـ ماس ـ نحاس ـ ماغنسيوم ـ منجنيز ـ رخام ـ دقيق ـ نيكل ـ فوسفور ـ بلاتين ـ كوارتز ـ زئبق ـ حمض نيتريك ـ حمض هيدروكلوريك ـ حجر رملى ـ حمض/كبريتيك ـ كبريت ـ فضة ـ تلك ـ صلب ـ فحم حجرى ـ طين ـ قطران ـ زنك ـ طوب ....] فإنها تغطس تحت الماء . وهناك ماله مدى واسع من الكثافة كأنواع الخشب المختلفة والجير والأسمنت فمنها ما يطفو على الماء ومنها ما يغطس تحت الماء .

الوزن النوعى (S .G) للأجسام الصلبة والسائلة .

المادة	الوزن النوعى	المادة	الوزن النوعى
بنزين	٠,٦٨ ـ ٠,٧٠	ألومنيوم	٢,٦٠
كحول	٠,٧٩	بروم	٣,١٨
بترول	٠,٨٢	باريوم	٣,٧٠
بوتاسيوم	٠,٨٦	يود	٤,٩٠ ـ ٤,٩٣
بارفين	٠,٩٠	زرنيخ	٥,٧٠
بنزول	٠,٩٠	أنتيمون	٦,٧٠
ثلج	٠,٩٠	كروم	٦,٨٠
شمع	٠,٩٧	زنك	٧,١٣
صوديوم	٠,٩٧	منجنيز	٧,٤٢
ماء مقطر	على ٤ْ م ١,٠٠	حديد	٧,٨٦
كالسيوم	١,٥٨	نحاس	٨,٩٠
ماغنسيوم	١,٧٤	نيكل	٨,٩٠
فوسفور	١,٨٢ ـ ١,٨٣	فضة	١٠,٦
كبريت	٢,٠٠ ـ ٢,٠٦	رصاص	١١,٣
كلوريد صوديوم	٢,١٦	زئبق	١٣,٥٩
بورسلان	٢,٥٠	ذهب	١٩,٣٣
سترانشيوم	٢,٥٠	بلاتين	٢١,٤٥

درجة تجمد الغازات والسوائل

نظام التجميد	درجة حرارة التجميدْ م
أوكسجين سائل ⇄ أوكسجين غاز	ـ ١٨٣,٠
ثانى أوكسيد كربون صلب ⇄ ثانى أوكسيد كربون غاز	ـ ٧٨,٥
أمونيا سائلة . أمونيا غازية	ـ ٣٣,٤
ثلج (ماء صلب) ⇄ ماء (سائل)	صفر

بعض المذيبات العضوية ووسيلة تجفيفها

المذيب	مادة التجفيف أو وسيلة التجفيف
أسيتون	كلوريد كالسيوم ، كربونات بوتاسيوم
أسيتونتريل	كلوريد كالسيوم ، حمض فوسفوريك
إيثانول	أوكسيد كالسيوم ، ماغنسيوم
إيثانول جليكول	تقطير ، كبريتات صوديوم
أنيلين	أيدروكسيد بوتاسيوم ، أوكسيد باريوم
بنزين	تقطير ، كلوريد كالسيوم ، صوديوم
بيوتانول (١ أو ٢)	تقطير ، كربونات بوتاسيوم
كلوروفورم	كلوريد كالسيوم ، حمض فوسفوريك
سيكلوهكسان	صوديوم
داى إيثيل إثير	صوديوم ، كلوريد كالسيوم
ديوكسان	صوديوم ، كلوريد كالسيوم
خلات إيثايل	حمض فوسفوريك ، كربونات بوتاسيوم
حمض خليك	حمض فوسفوريك ، كبريتات نحاس
جليسرين	تقطير
هكسان (ن)	صوديوم
أيزوبيوتانول	كربونات بوتاسيوم ، أكسيد كالسيوم ، مغ ، كا
أيزوبروبانول	أوكسيد كالسيوم ، ماغنسيوم
ميثانول	أوكسيد كالسيوم ، كلوريد كالسيوم ، ماغنسيوم
تولول	تقطير ، صوديوم ، كلوريد كالسيوم

ومن وسائل التجفيف بوجه عام

كبريتات نحاس جافة	$Cu\ SO_4$	كبريتات كالسيوم	$Ca\ So_4$
كلوريد زنك	$Zn\ Cl_2$	حمض كبريتيك مركز	$H_2\ SO_4$
كلوريد كالسيوم	$Ca\ Cl_2$	أوكسيد ألومنيوم	$Al_2\ O_3$
أوكسيد كالسيوم	Ca O	هيدروكسيد بوتاسيوم	K OH
هيدروكسيد صوديوم	Na OH	سليكا چيل	$(Si\ O_2)X$
أوكسيد ماغنسيوم	Mg O	بيركلورات ماغنسيوم جافة	$Mg\ (CLO_4)_2$

تحضير بعض المحاليل القياسية والدلائل

فيما يلى الكميات المطلوبة من الأملاح الجافة اللازمة لعمل محاليل قياسية أساسية قوتها ٠,١ أساسى ، والأملاح جافة ويمكن تسخينها دون تغيير تركيبها :

تحضير بعض المحاليل القياسية والدلائل :

كربونات صوديوم جافة	٥,٣٠٠ جم / لتر
أوكسالات صوديوم	٦,٧٠٠ جم / لتر
كلوريد صوديوم	٥,٨٤٥ جم / لتر
يودات بوتاسيوم	٣,٥٦٧ جم / لتر
ثانى كرومات بوتاسيوم	٤,٩٠٤ جم / لتر

والمحاليل القياسية الثانوية لمركبات حساسة للرطوبة فقد تكتسبها أو تفقدها طبقاً لرطوبة الجو ، ويجب العناية بعند تخزينها ، وتحضر منها محاليل ٠,١ أساسى كما يلى :

كبريتات أمونيوم حديدوز	٣٩,٢١ جم / لتر
حامض أوكساليك	٦,٣٠٢٥ جم / لتر
نيترات فضة	١٦,٩٨٩ جم / لتر
فثالات بوتاسيوم هيدروچينية	٢٠,٤١ جم / لتر
طارطارات بوتاسيوم أنتيمون	١٦,٢٤٥ جم / لتر
رباعى بورات صوديوم	١٩,٠٧ جم / لتر

محلول اليود ٠,١ ع (١٢,٦٩٣ جم يود / لتر) :

أذب ١٣,٥ جم يود فى محلول من ٢٤ جم يوديد بوتاسيوم فى ٢٠٠ مل ماء وخفف إلى لتر . عاير المحلول بالتنقيط مع حجم معلوم من محلول قياسى من الثيوكبريتات باستخدام دليل النشا كدليل للتعادل .

محلول نيترات الفضة ٠,١ ع $Ag\,NO_3$:

بطريقة Mohr أذب كمية أكبر قليلا من المطلوب (١٧,٢ جم بدلا من ١٦,٩٨٩حجم) من نيترات الفضة فى ماء وخفف إلى لتر . زن بالضبط ٠,٢٥ جم من كلوريد صوديوم (مجففة على ١١٠° م قبل الوزن) ، وانقلها إلى دورق مخروطى سعة ٢٥٠ مل بمقدار ٥٠ مل ماء خالى الهالوچين . أضف ١ مل محلول ٥ ٪ كرومات بوتاسيوم فى ماء كدليل . نقط بالنيترات حتى ترسيب لون بنى محمر شاحب . أجر تجربة خالية

Blank باستخدام ٧٥ ـ ١٠٠ مل ماء مع ١ مل دليلاً ، واحسب العيارية من الحجم الصافى ، حيث العيارية =

$$\frac{\text{وزن كلوريد الصوديوم جم} \times ١٠٠٠}{\text{حجم نيترات الفضة} \times ٥٨,٤٥}$$

دليل الفينولفثالين :

أذب١ جم من الدليل فى ١٠٠ مل كحول إيثايل .

دليل أحمر المثيل :

أذب ١ جم دليلا فى ١٠ مل كحول إيثايل ٩٥٪ . هذا الدليل سهل اختزاله بفقد لونه؛ لذا تجرى المعايرة فى الحال بعد إضافته للمحلول .

دليل برتقالى المثيل :

أذب ٠,٥ جم دليلا فى لتر ماء .

دليل أزرق البروموفينول :

أذب ٠,١ جم فى ٢٥ مل ماء ثم خفف إلى ١٠٠ مل .

دليل مخلوط أحمر المثيل ـ أزرق المثيلين :

اخلط حجوما متساوية من ٠,٢ ٪ أحمر المثيل (المائى) مع ٠,١ ٪ أزرق المثيلين (المائى) .

دليل أزرق المثيلين :

بإذابة ١ جم فى ماء وإكماله إلى ١٠٠ مل .

دليل بروموكريزول جرين :

يحضر ٠,١ ٪ بروموكريزول جرين ، وكذلك يحضر ٠,٠٢ ٪ أحمر ميثايل ، والمذيب كحول إيثايل ٦٠ ٪ ، ثم يخلط الدليلان معا بنسبة ٢ : ٣ حجماً .

دليل النشا :

يحضر محلول ١ ٪ بإذابة النشا القابل للذوبان فى الماء مع التسخين حتى التشبع ، أو اخلط ٠,٥ جم نشا مع ١٥ مل ماء وانقلها إلى ١٠٠ مل ماء ساخناً واغل لمدة دقيقة .

محلول فهلنج (أ) + (ب) :

(أ) يتكون من ٥ جم كبريتات نحاس ، ١٨,٤ جم إكسالات بوتاسيوم ، ٠,٧ جم أيودات

بوتاسيوم .

(ب) ٢٩,٤ جم كربونات صوديوم لامائية ، ٨,٤ جم بيكربونات صوديوم ، ١٤,١ جم طرطرات صوديوم وبوتاسيوم (ملح روشيل) .

يذاب كل مركب من مركبات فهلنج (أ) فى كمية ماء دافئ ثم تخلط كلها معاً فى ٣٠٠ مل من المحلول ، ثم يذاب كل من أفراد فهلنج (ب) فى كمية مناسبة من الماء ثم تخلط أفراد فهلنج (ب) مع بعضها فيما لا يزيد عن ٣٠٠ مل . يخلط فهلنج أ + ب معا فى دورق معيارى سعة لتر ، ويكمل للعلامة بالماء المقطر ، ويحفظ فى زجاجات جواهر كشافة .

محلول ثانى كرومات بوتاسيوم ٠,١ ع (٤,٩٠٣٧ جم / لتر) :

زن ٤,٩٠٣٧ جم بلورات داى كرومات بوتاسيوم مجففة على ١٢٠ ـ ١٤٠° م لمدة ٢ـ ٤ ساعات فى ٢٠٠ مل ماء ، وانقلها إلى دورق معيارى سعة لتر وخفف إلى لتر واخلط .

يمكن وزن حوالى ٥ جم بالضبط بدلا من ٤,٩٠٣٧ جم على أن تحسب العيارية كالتالى

$$ع = \frac{\text{الوزن بالضبط}}{٤٩,٠٣٧}$$

محلول برمنجنات بوتاسيوم ٠,١ ع (٣,٢٦٠٦ جم / لتر) :

زن حوالى ٣,٣ بالضبط من البرمنجنات الجافة فى حوالى ٢٠٠ مل ماء ، وانقلها إلى دورق معيارى سعة لتر ، وأكمل للعلامة بالماء ، ثم اضبط عياريتها بالمعايرة مع محلول أوكسالات صوديوم كما سيلى بعد .

محلول هيدروكينون :

أذب ٠,٥ جم هيدروكينون فى ١٠٠ مل ماء ، ثم أضف نقطة حمض كبريتيك مركز لتأخير عملية النشدرة .

موليبدات أمونيوم :

أذب ١٥ جم موليبدات أمونيوم فى ٣٠٠ مل ماء مقطرا ، وسخن حتى ٥٠° م ثم برد ورشح . أضف ٣٥٠ مل حمض هيدروكلوريك ١٠ ع برد . خفف إلى لتر . تحفظ فى زجاجة غامقة محكمة القفل ، وتحضر طازجة كل شهرين .

محلول نسلر :

١ ـ زن ٣٧,٥ جم يودور بوتاسيوم ثم أذبها فى ٢٥ مل ماء مقطرا.

٢ ـ زن ٢٨,١ جم يود وأذبها فى المحلول السابق (١) .

٣ ـ زن ٣٧,٥ جم زئبق وانقلها إلى دورق معيارى سعة ٢٥٠ مل .

٤ ـ أضف الخطوة (٢) إلى الدورق المعيارى . اغلقه جيدا ورج دائريا حتى يحمر اللون فضعه أسفل تيار ماء بارد واستمر فى الرج الدائرى حتى يصير اللون أصفر مخضرا وينفرد الزئبق .

٥ ـ صب المحلول المكون من مخلوط يودور البوتاسيوم ويودور الزئبق فى دورق معيارى آخر سعة ٢٥٠ مل (بحيث يستبعد الزئبق المنفرد) وأكمل إلى العلامة بالماء المقطر.

٦ ـ أضف محتويات الدورق السابق (خطوة ٥) إلى ١٢١٩ مل ص أ يد ١٠ ٪ خالية الكربونات (بتحضير محلول ص أ يد بنسب ١ : ١ من ص أ يد والماء ويترك ٢٤ ساعة حتى تظهر أملاح الكربونات على السطح ، فيصب المحلول الرائق ويستخدم فى التحضير، وتضبط عياريته بعد تحديدها بالمعايرة مع حامض يد كل).

٧ ـ راقب باستمرار محلول نسلر من حيث قلويته إذ أن كل ٢ مل يد كل ١ ع ≡١١ ـ ١١,٥ مل من محلول نسلر .

محلول مورجان Morgan's Reagent :

يتكون من ٣٠ مل حمض خليك + ١٠٠ جم خلات صوديوم فى ماء مقطر حتى لتر .

حامض يد كل ٠,١ ع (٣,٦٤٦جم / لتر) :

يخفف ٩,٨٢ مل يد كل مركزا إلى لتر بماء مقطر في دورق معيارى سعة لتر ، ويعاير بمحلول ص أ يد ٠,١ ع فى وجود دليل أحمر ميثيل ، أو باستخدام جهاز PH إلى رقم حموضة ٨,١ .

حامض يد٢ كب أ٤ ٠,١ ع(٤,٩٠٤ جم / لتر) :

يخفف ٢,٦٨ مل يد٢ كب أ٤ مركزا فى دورق معيارى سعة لتر بواسطة الماء المقطر حتى العلامة ، ثم يعاير بمحلول ص أ يد ٠,١ ع فى وجود دليل الفينولفثالين ، أو باستخدام جهازPH إلى رقم حموضة ٨,١ .

حامض يد٢ كب أ٤ ٠,٠١٤٣ ع :

يحضر بإضافة ٠,٣٨ مل حامض مركز ويكمل إلى لتر بماء مقطر ، مع ضبط العيارية بمعادلة المحلول مع وزنة معلومة من كبريتات الصوديوم اللامائية مستخدماً دليل فينولفثالين.

حامض أوكساليك ١ ع (٦٣,٠٢٣ جم / لتر) :

بإذابة ٦٣,٠٢٣ جم حمض أوكساليك فى ماء مقطر ويكمل إلى لتر . المحاليل الأقل

تركيزا تكون غير ثابتة ؛ ولذا تحضر طازجة ، أما المحاليل الأكثر تركيزا يصحبها ترسيب لبعض الحامض عند تبريدها لكنها ثابتة على حرارة الغرفة إذا ما كانت بعيدة عن الضوء .

ثيوسلفات صوديوم ٠,١ ع (٢٨,٨١٩٢ جم / لتر) :

يذاب ٢٥ جم من الثيوكبريتات فى ٢٠٠ مل ماء ثم انقلها إلى دورق معيارى سعة لتر، وأكمل بالماء واخلط واتركه عدة أيام ، واسحب الجزء الرائق وعاير جزءا منه مع بيكربونات البوتاسيوم ، بوزن ٠,٢٠ ـ ٠,٢٣ جم من البيكرومات الجافة (٢ ساعة على ١٠٥° م) فى كأس سعة ٢٥٠ مل مع ١٥٠ مل ماء ، مع إضافة ٢ جم يوديد بوتاسيوم ، واخلط ثم أضف ٢٠ مل حمص يد كل ١ ع ، واتركه ١٠ دقائق ثم نقط الثيوكبريتات من السحاحة مع إضافة ١ مل نشا (بعد تنقيط حوالى ٨٠ ٪ من الثيوكبريتات اللازمة للتعادل) ، وأكمل التنقيط حتى يتحول اللون الأخضر المزرق إلى أخضر فاتح فتكون العيارية =

$$\frac{\text{وزن بيكرومات البوتاسيوم جم} \times ١٠٠٠}{\text{حجم ثيوكبريتات الصوديوم مل} \times ٤٩,٠٣٧} .$$

محلول مشبع من ص أ يد :

يذاب مع الرّج ١١٠ جم ص أ يد نقية فى ١٠ مل ماء مقطرا فى دورق مخروطى من البيركس ، وتقفل فوهته بإحكام ويترك يومان حتى ترسب الكربونات تاركة محلولا رائقا من ص أ يد خال من الكربونات يحتوى ٧٥جم ص أ يد / ١٠٠ مل .

محلول عيارى من ص أ يد (٤٠,٠٠٥ جم / لتر) :

أذب ٤٠,٠٠٥ جم ص أ يد حبوباً فى ماء مقطر وخفف إلى لتر فى دورق معيارى .
عاير باستخدام حمض كبريتيك قياسى (معاير باستخدام كربونات صوديوم المجففة ٨ ساعات على ١٠٥° م بوزن ١,٣٢٥٠ جم بالضبط وإذابتها وتخفيفها إلى ٢٥٠ مل (٠,١ ع) ، فيؤخذ ٢٥ مل حمض كبريتيك ٠,١ ع فى دورق مخروطى + ١٠٥ مل ماء + ٤ نقط دليل أزرق بروموفينول ونقط بمحلول كربونات الصوديوم ٠,١ ع بالسحاحة إلى تحول اللون للأزرق أو بجهاز P H إلى درجة حموضة ٤,١) .

تقدير قوة محلول نترات الفضة :

١ ـ يضاف ٥ مل من دليل الحديديك (٥ جم كبريتات حديديك وألمونيوم (شب الحديد) تذاب فى ٥٠ مل ماء مقطراً ، ثم يضاف إليها ٥٠ مل حامض نيتريك مركزا خالى الكلوريدات ، ثم يغلى المحلول بشدة للتخلص من أكاسيد النيتروجين) إلى ٢٥ مل محلول نترات فضة (٠,١ ع ، ١٦,٩٩جم نترات فضة/لتر) ، ويخفف المحلول إلى ٧٥ مل.

٢ ـ ينقط بمحلول ثيوسيانات بوتاسيوم (١٠جم فى لتر ماء مقطر) من السحاحة مع استمرار التحريك ، ويظهر لون بنى ثابت دليلا على انتهاء التفاعل (وتكوين ثيوسيانات الحديديك بنية اللون) مع استقرار الراسب .

٣ ـ يوزن بدقة ١٣,٠ ـ ١٤,٠ جم كلويد صوديوم نقية جافة وتذاب فى ٢٠ ـ ٣٠ مل ماء مقطرا فى دورق ذى سدادة .

٤ ـ يضاف ١ مل من حامض النيتريك المخفف + ٢٥ مل محلول نترات فضة إلى كلوريد الصوديوم ، ويرج بشدة حتى تتجمع حبيبات الراسب فى القاع تاركة سائلا رائقا فوق السطح .

٥ ـ يتم الترشيح ويجمع الراشح ، ويغسل الراسب جيدا بالماء البارد وحتى يمكن التخلص من النترات فى الراسب .

٦ – يضاف دليل الحديديك إلى الراشح ، وتجرى عملية التعادل بثيوسيانات البوتاسيوم كما فى الخطوة الثانية .

٧ ـ قوة نترات الفضة بالعيارى = (وزن عينة كلوريد الصوديوم × ١٠٠٠) / (الوزن المكافئ لكلوريد الصوديوم (٥٨,٤٦)× (حجم نترات الفضة المضافة لكلوريد الصوديوم (٢٥) – (حجم نترات الفضة المضافة لكلوريد الصوديوم × حجم الثيوسيانات اللازمة لتنقيط الراشح فى الخطوة السادسة / حجم الثيوسيانات التى عادلت ٢٥ مل نترات فضة من الخطوة الثانية) .

تقدير قوة يد$_{٢}$ كب أ$_{٤}$ بواسطة ص$_{٢}$ ك أ$_{٣}$:

يوزن قدر معين من الكربونات اللامائية النقية مع ٣٠ مل ماء مقطرا ، وإضافة ٥ نقط برتقالى مثيل ، وينقط بالحامض حتى ظهور لون برتقالى ويسخن لطرد ك أ$_{٢}$ ، فيتحول اللون إلى الأصفر ثانية ، فينقط بالحامض ثانية لظهور لون برتقالى ، فتحسب قوة الحامض حيث إن قوة الحامض = $\frac{\text{وزن كربونات الصوديوم جم} \times ١٠٠٠}{\text{حجم الحامض (مل)} \times ٥٣}$.

تقدير قوة محلول برمنجنات البوتاسيوم :

١ ـ زن بدقة ١٧,٠ ـ ١٩,٠ جم إكسالات صوديوم نقية لامائية (مجففة على ١٢٠° م لمدة ساعة) وتوضع فى دورق مخروطى .

٢ ـ تذاب فى ٣٠ مل حامض كبريتيك ١٠ ع ويخفف الناتج إلى ٥٠ ـ ٦٠ مل بماء مقطر.

٣ ـ سخن إلى قرب الغليان (٩٠° م) .

٤ ـ نقط وهو ساخن ببرمنجنات البوتاسيوم ببطء مع التحريك المستمر حتى ظهور لون محمر باهت .

٥ ـ ظهور لون بنى أو راسب بنى راجع لعدم كفاية الحامض اللازم لاختزال البرمنجنات ، أو راجع لسرعة التنقيط ، أو لعدم تسخين المحلول قبل التنقيط ، فإذا ظهر الراسب البنى يعاد التنقيط على كمية أخرى جديدة من الإكسالات .

٦ ـ يلاحظ عدم إضافة أى دليل ، ويلاحظ كذلك أن البرمنجنات تضر بالمطاط فيجب أن تكون السحاحة ذات صنبور زجاجى .

٧ ـ ينظر إلى السطح العلوى للبرمنجنات بالسحاحة مع وضع ورقة بيضاء خلفها ليسهل رؤية المحلول أفقيا .

٨ ـ تحسب قوة البرمنجنات كالتالى :

$$\text{قوة البرمنجنات} = \frac{١٠٠٠ \times \text{وزن الأكسالات (جم)}}{٦٧ \times \text{حجم البرمنجنات (مل)}}$$

٣ - الوحدات المختلفة

وحدات الموازين والمكاييل Units of Weights & Measures :

الكيلوجرام :

هو وزن ١٠٠٠ سم٣ من الماء عند درجة حرارة ٣,٩٨°م .

اللتر :

هو وحدة الحجوم الأساسية ، ويعرف بأنه حجم كيلوجرام من الماء النقى على درجة حرارة ٤°م عند ضغط جوى ٧٦٠م زئبق . واللتر هو عبارة عن ١ ديسيمتر مكعب (1L = Idm^3)

المللتر :

عبارة عن جزء من ألف من اللتر ، وهو تقريبا (وليس بالضبط) عبارة عن سنتيمتر مكعب (1 ml. = 1 cm^3) ، والعلاقة المضبوطة بين الملليلتر والسنتيمتر المكعب هى 1000 ml. = 1000.027 c. c.) أن اللتر (١٠٠٠ سم٣) يساوى ١٠٠٠,٠٢٧ سم٣ . والسنتيمتر المكعب انحدر من الوحدة القياسية للطول أى المتر ، وقد أشير دائما أن ١ سم٣ يزن ١ جم ، إلا أن المقاييس الأكثر دقة أوضحت الفارق البسيط المذكور أعلى .

أجزاء الوحدات :

وفى استخدام الكميات البسيطة تستخدم المقاطع prefixes الآتية :

المقطع		معامل الضرب	الرمز
ديسى	deci	10^{-1}	d
سنتى	centi	10^{-2}	c
ميللى	milli	10^{-3}	m
ميكرو	micro	10^{-6}	u
نانو	nano	10^{-9}	n
بيكو	pico	10^{-12}	p
فنتو	fento	10^{-15}	f
التو	alto	10^{-18}	a

وقد يطلق على النانومتر (nm) كذلك ملليميكرون (mu) فالميكرون (u) يساوى ١٠٠٠/١ ملليمتر ، ويطلق على الميكروجرام (ug) كذلك جاما (لها) .

وعند استخدام الكميات الكبيرة تستخدم المقاطع الآتية :

المقطع		معامل الضرب	الرمز
ديكا	deca	10	da
هكتو	hecto	10^{2}	h
كيلو	kilo	10^{3}	K
ميجا	mega	10^{6}	M
جيجا	giga	10^{9}	G
ترا	tera	10^{12}	T
بيتا	peta	10^{15}	P
إكسا	exa	10^{18}	E

وحدات القياس وتحويلاتها

وحدات الطول	كيلومتر(Km)	متر (m)	ديسيمتر(dm)	سنتيمتر (cm)	مليمتر (mm)
كيلو متر	١	١٠٠٠	١٠ ٠٠٠	١٠٠ ٠٠٠	١٠٠٠٠٠٠
متر	٠,٠٠١	١	١٠	١٠٠	١٠٠٠
ديسيمتر	٠,٠٠٠١	٠,١	١	١٠	١٠٠
سنتيمتر	٠,٠٠٠٠١	٠,٠١	٠,١	١	١٠
مليمتر	٠,٠٠٠٠٠١	٠,٠٠١	٠,٠١	٠,١	١

١ مليمتر = ١٠٠٠ ميكرون .

والمتر وحدة القياس الأساسية وهو المسافة بين خطين تحت ظروف مناسبة محفورة على نموذج محفوظ فى المكتب الدولى للمقاييس بفرنسا .

وحدات المساحات	Km^2	ha	a	m^2
كيلومتر مربع Km^2	١	١٠٠	١٠٠٠٠	١٠٠٠٠٠٠
هكتار ha	٠,٠١	١	١٠٠	١٠٠٠٠
ر a (Ar)	٠,٠٠٠١	٠,٠١	١	١٠٠
متر مربع m^2	٠,٠٠٠٠٠١	٠,٠٠٠١	٠,٠١	١

١ م٢ = ١٠٠ ديسيمتر مربع .

١ ديسيمتر مربع = ١٠٠ سم٢.

١ سم٢ = ١٠٠ مم٢.

وحدات الحجوم	m^3	dm^3	cm^3	mm^3
متر مكعب m^3	١	١٠٠٠	١٠٠٠٠٠٠	١٠٠٠٠٠٠٠٠٠
ديسيمتر مكعب dm^3	٠,٠٠١	١	١٠٠٠	١٠٠٠٠٠٠
سنتيمتر مكعب cm^3	٠,٠٠٠٠٠١	٠,٠٠١	١	١٠٠٠
مليمتر مكعب mm^3	٠,٠٠٠٠٠٠٠٠١	٠,٠٠٠٠٠١	٠,٠٠١	١

	m^3	hl	l	dl	cl
متر مكعب m^3	١	١٠	١٠٠٠	١٠٠٠٠	١٠٠٠٠٠
هكتولتر hl	٠,١	١	١٠٠	١٠٠٠	١٠٠٠٠
لتر l	٠,٠٠١	٠,٠١	١	١٠	١٠٠
ديسيلتر dl	٠,٠٠٠١	٠,٠٠١	٠,١	١	١٠
سنتيلتر cl	٠,٠٠٠٠١	٠,٠٠٠١	٠,٠١	٠,١	١

١ مليلتر = ١ سم٣ = ١٠٠٠ ميكرولتر (U1)

الأوزان	Kg	g	Cg	Mg
طن t	١٠٠٠	١٠٠٠٠٠٠	١٠٠٠٠٠٠٠٠	١٠٠٠٠٠٠٠٠٠
كيلوجرام Kg	١	١٠٠٠	١٠٠٠٠٠	١٠٠٠٠٠٠
جرام g	٠,٠٠١	١	١٠٠	١٠٠٠
سنتيجرام cg	٠,٠٠٠٠١	٠,٠١	١	١٠
مليجرام mg	٠,٠٠٠٠٠١	٠,٠٠١	٠,١	١

١ جزء / مليون (part per million (ppm = ١ × ١٠^-٦^ = مجم / كجم ، أو ميكروجرام/ جم .

١ جزء / بليون (part per billion (ppb = ١ × ١٠^-٩^ =ميكروجرام/ كجم ، أو نانوجرام/ جم .

١ جزء / ترليون (part per trillion (ppt = ١ × ١٠^-١٢^ =نانوجرام/ كجم ، أو بيكوجرام/ جم .

علاقة المكاييل المصرية بالموازين المترية :

حمل التبن	٢٤٩,٦٠٠ كيلو جرام
أردب أرز خام	٢٩١,٠٠٠ كيلو جرام
أردب أرز مقشور	١٧٩,٠٠٠ كيلو جرام
أردب بذرة قطن	١٢١,٣٠٠ كيلو جرام
أردب بذرة كتان	١٢٠,٠٠٠ كيلو جرام
أردب ذرة شامية	١٤٠,٠٠٠ كيلو جرام
أردب ذرة صيفى	١٣٥,٠٠٠ كيلو جرام
أردب شعير	١٢٠,٠٠٠ كيلو جرام
أردب فول	١٥٥,٠٠٠ كيلو جرام
أردب نخالة	٦٧,٥٠٠ كيلو جرام
أردب قمح	١٥٠,٠٠٠ كيلو جرام
أردب ذرة رفيعة	١٤٠,٠٠٠ كيلو جرام
أردب ذرة شامية بالقوالح	١٩٠,٠٠٠ كيلو جرام
ضريبة أرز شعير	٩٤٥,٠٠٠ كيلو جرام

وحدات الضغط :

١ رطل / بوصة مربعة Ib per sq in (psi) = ٠,٠٧ كجم / سم٢
= ٥١,٧ مم زئبق
= ٧٠,٣ سم ماء
= ١,٣٦ سم ماء

١ مم زئبق = ٠,٧٣ مم زئبق

١ سم ماء = ٧٦٠ مم زئبق

١ جوى = ١٤,٧ رطل / بوصة مربعة
= ٢٩,٩ بوصة زئبق
= ١,٠٣ كجم / سم٢
= ٣٣,٩ قدم ماء
= ٧٦٠ تور Torr
= ١٠١٣,٢٥ ميللى بار Millibar
= ١٠٠ كيلو باسكل (kpa).

الوحدات القياسية الدولية :

الطول	متر	م	m
الكتلة	كيلو جرام	كجم	kg
الزمن	ثانية	ث	s
تيار كهربى	أمبير		A
درجة حرارة ديناميكا حرارية	كلفين	ك	k
كمية المادة	مول		mol
شدة الإضاءة	شمعة(قنديل)		cd
المساحة	متر مربع	م٢	.m2
معدل الميتابوليزم الأساسى	الوزن/ المساحة	الوزن/ م ٢	W.m-2
الضغط	بار	كجم ٠,٧٥	kpa
الطاقة	چول		J
درجة الحرارة	درجة مئوية	م°	c°
طول الموجة	نانومتر		nm
الكثافة	كيلو جرام/م٣	كجم / م٣	kg.m3
الحجم	متر مكعب	م٣	m3

وفيما يلى علاقة النظامين الإنجليزى والمترى لبعض الوحدات المستعملة :

عوامل التحويل لوحدات أخرى :

مـــن	إلى	العامل ×
درجات الحرارة		
درجة فهرنهيت + ٤٥٩,٧٢	درجة فهرنهيت مطلقة أو رانكين	١
درجة فهرنهيت − ٣٢	(R)	٩/٥
درجة مئوية + ٢٧٣,١٦	درجة مئوية C	١
درجة مئوية + ١٧,٧٨	درجة مئوية مطلقة أو كلفين (k)	١,٨
درجة رانكين − ٤٥٩,٧٢	درجة فهرنهيت (F)	١
درجة كلفين − ٢٧٣,١٦	درجة فهرنهيت	١
	درجة مئوية	
ضغط		
دين / سم٢	رطل / بوصة مربعة (Psi)	١,٤٥٠٤×١٠−٥
	جم / سم٢ (g / cm2)	١٠,١٩٧×١٠−٤
	بار (bar)	١×١٠−٦

مـن	إلى	العامل ×
	ضغط	
رطل/بوصة مربعة مطلقة (psia)	جم / سم٢ مطلق	٧٠,٣٠٧
	م زئبق مطلق	٥١,٧١٥
	رطل / قدم مربع مطلق	١٤٤
	رطل / بوصة مربعة مقياس + ١٤,٦٩٦	١
رطل/ بوصة مربعة مقياس (psig)	جم / سم٢	٧٠,٣٠٧
	م زئبق على صفر مئوى (تور) (Torr)	٥١,٧١٥
	بوصة ماء على ٤°م	٢٧,٦٧٣
	رطل/بوصة مربعة مطلقة − ١٤,٦٩٦	١
بوصة ماء على ٤°م	رطل / بوصة مربعة	٠,٠٣٦١٤
	بوصة زئبق	٠,٠٧٣٥٥
	أوقية / بوصة مربعة	٠,٥٧٨١٨
	كجم / م٢ (kg / m2)	٢٥,٣٩٩
	دين / سم٢	٢٤٩٠,٨
بوصة زئبق على ٣٢°ف	رطل / بوصة مربعة	٠,٤٩١١٦
	بوصة ماء على ٤°م	١٣,٥٩٥
	كجم / م٢	٣٤٥,٣١
	دين / سم٢	٣,٣٨٦٤ ×١٠^٤
سم زئبق على صفر مئوى (تور)	رطل / بوصة مربعة	٠,٠١٩٣٤
	جم / سم٢	١,٣٥٩٥
	دين / سم٢	١٣٣٣,٢
	دين / سم٢	١,٣٣٣٢ ×١٠^٤

مـن	إلى	العامل ×
	ضغط	
	كجم / م٢	١٣٥,٩٥
	رطل / قدم مربع	٢٧,٨٤٥
جوى (طبيعى)	م زئبق على صفر مئوى (تور)	٧٦٠
	بار	١,٠١٣٣
	رطل / بوصة مربعة	١٤,٦٩٦
	بوصة زئبق على ٣٢°ف	٢٩,٩٢١
	جم / سم٢	١٠٣٣,٢
	دين / سم٢	$١,٠١٣٣ \times ١٠^{٦}$
بار	رطل / بوصة مربعة	١٤,٥٠٤
	كجم / م٢	$١,٠١٩٧ \times ١٠^{٤}$
	دين / سم٢	$١,٠٠٠ \times ١٠^{٦}$
	م زئبق على صفر مئوى (تور)	٧٥٠,٠٦
	جوى	٠,٩٨٦٩٢
	كثافة	
جم / سم٣	جم / مل	١
	رطل / بوصة مكعبة	٠,٠٣٦١٣
	رطل / جالون (أمريكى)	٨,٣٤٥٢
	رطل / قدم مكعب	٦٢,٤٢٨
رطل / قدم مكعب	ج / سم٣	٠,٠١٦٠٢
	رطل / بوصة مكعبة	$٥,٧٨٧٠ \times ١٠^{-٤}$
	التركيز	
جزء / بليون (ppb)	جزء / مليون (ppm)	١×١٠^{-٣}

مـــن	إلى	العامل ×
التركيز		
١ ٪ بالحجم	جزء / مليون	١٠٠٠٠
مجم / لتر	مجم / م^{٣}	١٠٠٠
	ميكروجرام / م^{٣}	١×١٠^{٦}
مجم / م^{٣}	مجم / لتر	١×١٠^{-٣}
ميكروجرام / م^{٣}	مجم / لتر	١×١٠^{-٦}
أوقية / ١٠٠٠ قدم مكعب	جم / م^{٣}	١,٠٠٢١
قمحة / قدم مكعب	جم / م^{٣}	٢,٢٨٨٣
جزء / سم^{٣}	جزء / قدم مكعب	$٢,٨٣١٧ \times ١٠^{٤}$
	جزء / م^{٣}	١×١٠^{٦}
جزء / م^{٣}	جزء / سم^{٣}	١×١٠^{-٦}
	جزء / قدم مكعب	٠,٠٢٨٣٢
جم وزن جزيئي / لتر	مول / لتر	١
جزء / مليون بالوزن	مجم / لتر	١
مللى جم أو لتر أو متر	جم أو لتر أو متر	١×١٠^{-٣}
ميكرو جم أو لتر أو متر	جم أو لتر أو متر	١×١٠^{-٦}
نانو جم أو لتر أو متر	جم أو لتر أو متر	١×١٠^{-٩}
بيكو جم أو لتر أو متر	جم أو لتر أو متر	١×١٠^{-١٢}
فمتو جم أو لتر أو متر	جم أو لتر أو متر	١×١٠^{-١٥}
الطول		
انجستروم	متر (m)	١×١٠^{-١٠}
	بوصة	$٣,٩٣٧ \times ١٠^{-٩}$
	ميكرون (ميكرومتر) (u)	١×١٠^{-٤}
	سم	١×١٠^{-٨}

مـــن	إلى	العامل ×
	الطول	
	ملليميكرون (mu)	٠,١
ملليميكرون	متر	١×١٠^{-٩}
	سم	١×١٠^{-٧}
	انجستروم	١٠
ميكرون (ميكرومتر)	بوصة	$٣,٩٣٧\times١٠^{-٥}$
	متر	١×١٠^{-٦}
	سم	١×١٠^{-٤}
	انجستروم	١×١٠^{٤}
م	بوصة (أمريكى)	٠,٠٣٩٣٧
	ميكرون	١×١٠^{٣}
سم	بوصة (أمريكى)	٠,٣٩٣٧
	ميكرون	١×١٠^{٤}
	ملليميكرون	١×١٠^{٧}
	انجستروم	١×١٠^{٨}
متر	ميل	$٦,٢١٣٧\times١٠^{-٤}$
	ياردة (أمريكى)	١,٠٩٣٦
	بوصة (أمريكى)	٣٩,٣٧٠
	ملليميكرون	١×١٠^{٩}
	إنجستروم	١×١٠^{١٠}
كم	ميل (بحرى)	٠,٥٣٩٦١
	ميل	٠,٦٢١٣٧
	ياردة	١٠٩٣,٦
	قدم	٢٢٨٠,٨
بوصة (أمريكى)	ياردة	٠,٠٢٧٧٨

مــــن	إلى	العامل ×
	الطول	
	سم	٢,٥٤٠٠
	انجستروم	$٢,٥٤\times١٠^{٨}$
قدم (أمريكى)	متر	٠,٣٠٤٨
	سم	٣٠,٤٨
ياردة (أمريكى)	ميل	$٥,٦٨١٨\times١٠^{-٤}$
	متر	٠,٩١٤٤
	سم	٩١,٤٤
ميل (بحرى)	ميل	١,١٥١٦
	ياردة	٢٠٢٦,٨
	كم	١,٨٥٣٣
ميل (أمريكى)	ذراع	٣٢٠
	ميل (بحرى)	٠,٨٦٨٣٦
	كم	١,٦٠٩٤
	م	١٦٠٩,٤
	مساحة	
م٢	بوصة مربعة	٠,٠٠١٥٥
	م٢	١×١٠^{-٦}
	سم٢	٠,٠١
سم٢	ياردة مربعة	$١,١٩٦\times١٠^{-٤}$
	قدم مربع (ft^2)	٠,٠٠١٠٨
	بوصة مربعة	٠,١٥٥
	م٢	١×١٠^{-٤}
	م٢	١٠٠

مـــن	إلى	العامل ×
كم^{٢}	ميل مربع (أمريكي)	٠,٣٨٦١
	ياردة مربعة	١,١٩٦ × ١٠$^{-٦}$
	قدم مربع	١,٠٧٦٤ × ١٠$^{-٧}$
	م^{٢}	١ × ١٠^{٦}
	اكر (أمريكي)	٢٤٧,١
بوصة مربعة (أمريكي)	قدم مربع	٠,٠٠٦٩٦
	ياردة مربعة	٠,٠٠٠٧٧
	م^{٢}	٦,٤٥١٦ × ١٠$^{-٤}$
	سم^{٢}	٦,٤٥١٦
	مم^{٢}	٦٤٥,١٦
قدم مربع (أمريكي)	ميل مربع	٣,٥٨٧ × ١٠$^{-٨}$
	ياردة مربعة	٠,١١١١١
	بوصة مربعة	١٤٤
	م^{٢}	٠,٠٩٢٩
	سم^{٢}	٩٢٩,٠٣
	اكر	٢,٢٩٥٧ × ١٠$^{-٥}$
ميل مربع	اكر	٦٤٠
	ياردة مربعة	٣,٠٩٧٦ × ١٠^{٦}
	قدم مربع	٢,٧٨٧٨ × ١٠$^{-٧}$
	كم^{٢}	٢,٥٩
	م^{٢}	٢,٥٩ × ١٠$^{-٦}$
	حجوم	
م^{٣}	بوصة مكعبة	٦,١٠٢٣ × ١٠$^{-٥}$
	م^{٣}	١ × ١٠$^{-٩}$
	سم^{٣}	١ × ١٠$^{-٣}$

مــــن	إلى	العامل ×
	حجوم	
مل (ملليلتر)	أوقية (سائل ـ آمريكي)	٠,٠٣٣٨١
	بوصة مكعبة	٠,٠٦١٠٢
	لتر	$١×١٠^{-٣}$
	سم^{٣}	١
لتر	ياردة مكعبة	٠,٠٠١٣١
	جالون (أمريكي)	٠,٢٦٤١٨
	قدم مكعب	٠,٠٣٥٣٢
	أوقية (سائل ـ أمريكي)	٣٣,٨١٥
	بوصة مكعبة	٦١,٠٢٥
	م^{٣}	$١×١٠^{-٣}$
	سم^{٣}	$١×١٠^{٣}$
م^{٣}	ياردة مكعبة (أمريكي)	١,٣٠٧٩
	قدم مكعب (أمريكي)	٣٥,٣١٤
	جالون (أمريكي)	٢٦٤,١٧
	بوصة مكعبة	$٦,١٠٢٣×١٠^{٤}$
	لتر	$١×١٠^{٣}$
	سم^{٣}	$١×١٠^{٦}$
	مم^{٣}	$١×١٠^{٩}$
جالون (أمريكي)	ياردة مكعبة	٠,٠٠٤٩٥
	قدم مكعب	٠,١٣٣٦٨
	أوقية (سائل)	١٢٨
	بوصة مكعبة	٢٣١
	م^{٣}	٠,٠٠٣٧٨
	لتر	٣,٧٨٥٤
	مل	٣٧٨٥,٤
	سم^{٣}	٣٧٨٥,٤

مـــن	إلى حجوم	العامل ×
بوصة مكعبة (أمريكي)	ياردة مكعبة	$٢,١٤٣٣ \times ١٠^{-٥}$
	قدم مكعب	$٥,٧٨٧ \times ١٠^{-٤}$
	جالون (أمريكي)	٠,٠٠٤٣٣
	أوقية (سائل)	٠,٥٥٤١
	م^{٣}	$١,٦٣٨٧ \times ١٠^{-٥}$
	لتر	٠,٠١٦٣٩
	مل	١٦,٣٨٧
	سم^{٣}	١٦,٣٨٧
	م^{٣}	$١,٦٣٨٧ \times ١٠^{٤}$
قدم مكعب (أمريكي)	ياردة مكعبة	٠,٠٣٧٠٤
	جالون (أمريكي)	٧,٤٨١
	بوصة مكعبة	١٧٢٨
	م^{٣}	٠,٠٢٨٣٢
	لتر	٢٨,٣١٦
	سم^{٣}	$٢,٨٣١٦ \times ١٠^{٤}$
سم^{٣}	مل	١
	ياردة مكعبة	$١,٣٠٧٩ \times ١٠^{-٦}$
	قدم مكعب (أمريكي)	$٣,٥٣١٤ \times ١٠^{-٥}$
	جالون (أمريكي)	$٢,٦٤١٧ \times ١٠^{-٤}$
	أوقية (سائل ـ أمريكي)	٠,٠٣٣٨١
	بوصة مكعبة	٠,٠٦١٠٢
	م^{٣}	١×١٠^{-٦}
	م^{٣}	١×١٠^{٣}

مـــن	الى	العامل ×
	الزمن	
ثانية	يوم	$١,١٥٧٤\times ١٠^{-٥}$
	ساعة	$٢,٧٧٧٨\times ١٠^{-٤}$
	دقيقة	٠,٠١٦٦٧
دقيقة	أسبوع	$٩,٩٢٠٦\times ١٠^{-٥}$
	يوم	$٦,٩٤٤٥\times ١٠^{-٤}$
	ساعة	٠,٠١٦٦٧
ساعة	أسبوع	٠,٠٠٥٩٥
	يوم	٠,٠٤١٦٧
	ثانية	٣٦٠٠
يوم	دقيقة	١٤٤٠
	ثانية	$٨,٦٤\times ١٠^{٤}$
أسبوع	ساعة	١٦٨
	دقيقة	$١,٠٠٨\times ١٠^{٤}$
	ثانية	$٦,٠٤٨\times ١٠^{٥}$
شهر	يوم	٣٠,٤٢
	ساعة	٧٣٠
	دقيقة	$٤,٣٨\times ١٠^{٤}$
	ثانية	$٢,٦٢٨\times ١٠^{٥}$
سنة (ميلادية)	ساعة	٨٧٦٠
	دقيقة	$٥,٢٥٦\times ١٠^{٥}$
	سرعة	
سم / ثانية	ميل / دقيقة	$٣,٧٢٨٢\times ١٠^{-٤}$
	ميل / ساعة	٠,٠٢٢٣٧
	قدم / ثانية	٠,٠٣٢٨١

مـــن	إلى	العامل ×
	سرعة	
	كم / ساعة	٠,٣٦
	م / دقيقة	٠,٦
	قدم / دقيقة	١,٩٦٨٥
قدم / ثانية	ميل / دقيقة	٠,٠١١٣٦
	ميل / ساعة	٠,٦٨١٨٢
	كم / ساعة	١,٠٩٧٣
	م / دقيقة	١٨,٢٨٨
	سم / ثانية	٣٠,٤٨
م / دقيقة	ميل / ساعة	٠,٠٣٧٢٨
	قدم / ثانية	٠,٠٥٤٦٨
	كم / ساعة	٠,٠٦
	سم / ثانية	١,٦٦٦٧
	قدم / دقيقة	٣,٢٨٠٨
قدم / دقيقة	م / ثانية	٠,٠٠٥٠٨
	ميل / ساعة	٠,٠١١٣٦
	قدم / ثانية	٠,٠١٦٦٧
	كم / ساعة	٠,٠١٨٢٩
	م / دقيقة	٠,٣٠٤٨
	سم / ثانية	٠,٥٠٨
	الكتلة (أو الوزن)	
مجم	رطل	٢,٢٠٤٦×١٠−٦
	أوقية (oz)	٣,٥٢٧٤×١٠−٥
	قمحة	٠,٠١٥٤٣
	كجم	١×١٠−٦
ميكرو جرام	جم	١×١٠−٦
جم	رطل	٠,٠٠٢٢

مـــن	إلى	العامل ×
	الكتلة (أو الوزن)	
	أوقية	٠,٠٣٥٢٧
	قمحة	١٥,٤٣٢
	ميكروجرام	٦١٠×١
كجم	طن	٠,٠٠١١
	رطل	٢,٢٠٤٦
	أوقية	٣٥,٢٧٤
	قمحة	٤١٠×١,٥٤٣٢
قمحة	رطل	٤-١٠×١,٤٢٨٦
	أوقية	٠,٠٢٢٩
	جم	٠,٠٦٤٨
	مجم	٦٤,٧٩٩
أوقية	طن	٥-١٠×٣,١٢٥٠
	رطل	٠,٠٦٢٥
	قمحة	٤٣٧,٥
	جم	٢٨,٣٥
رطل	طن	٤-١٠×٥
	أوقية	١٦
	قمحة	٧٠٠٠
	كجم	٠,٤٥٣٥٩
	جم	٤٥٣,٥٩
طن (أمريكي)	رطل	٢٠٠٠
	أوقية	٤١٠×٣,٢٠٠
	كجم	٩٠٧,١٩
	الطاقــة	
كالوري كيماوي حراري	چول	٤,١٨٤
وحدة حرارية بريطانية	كيلوچول	١,٠٥٥

٤ ـ بعض معاملات التحويل

من	إلى	المعامل
أوكسيد كالسيوم	كالسيوم	٠,٧١٥
أوكسيد كالسيوم	كربونات كالسيوم	١,٧٨٥
أوكسيد ماغنسيوم	ماغنسيوم	٠,٦٠٣
أمونيا	بروتين	٥,١٤٠
بروتين	أمونيا	٠,١٩٥
بروتين	نيتروچين	٠,١٦٠
جزء / مليون كاروتين	وحدة أمريكية لفيتامين أ/جم	١,٦٧٠
جم / طن	مجم / رطل	٠,٥
چول	كالوري	٠,٢٣٨
حامض فوسفوريك	فوسفور	٠,٤٣٧
حديد	كبريتات حديد	٢,٧٢٠
فوسفور	حمض فوسفوريك	٢,٢٩٠
درجة فهرنهيت (ْف)	درجة مئوية	(ْف − ٣٢) × $\frac{٥}{٩}$
كالسيوم	أوكسيد كالسيوم	١,٣٩٩
كالسيوم	كربونات كالسيوم	٢,٥٠٠
كالوري	چول	٤,٢
كبريتات حديد	حديد	٠,٣٦٧
كبريتات نحاس	نحاس	٠,٣٩٨
كبريتات منجنيز	منجنيز	٠,٣٦٤
كربونات كالسيوم	كالسيوم	٠,٤٠٠
كربونات كالسيوم	أوكسيد كالسيوم	٠,٥٦٠
كلور	كلوريد صوديوم	١,٦٥

مـــن	إلى	المعامل
كلوريد صوديوم	كلور	٠,٦٠٧
درجة مئوية (°م)	°ف	(٥م × $\frac{٩}{٥}$) + ٣٢
ماغنسيوم	أوكسيد ماغنسيوم	١,٦٥٨
مجم / رطل	ميكروجرام / جم	٢,٢
منجنيز	كبريتات منجنيز	٢,٧٥
نحاس	كبريتات نحاس	٢,٥١
نيتروجين	بروتين	٦,٢٥

معاملات التحويل إلى وحـدات المعايرة الدوليـة (أي الوحدات القياسية الحـديثة)

: Systeme International D' Units (SI units)

من نظام قديم		إلى وحدات دولية حديثة	المعامل ×
البيومين	جم / ١٠٠	ميكرومول / لتر	١٤٤,٩٣
مل		مليمول / لتر	٠,٧١٤
أزوت أحماض أمينينة	مجم/ ١٠٠	مليمول / لتر	٠,٣٥٦
مل		مليمول / لتر	٠,٠٧٢٥
أزوت يوريا	مــــجم /	ميكرومول/لتر	٠,٥٨٧
١٠٠ مل		ميكرومول / لتر	٠,٢٠
أمونيا	مجم / ١٠٠	بيكومول / لتر	١٧٢,١٢
		جم / لتر	١٠,٠٠
أمونيا	ميكروجرام /١٠٠ مل ميكرومول/ لتر	ميكرومول/لتر	١١٣,٥٦
أنزيم جلوتاميك بيروفيك ترانس امنياز مجم		مليمول / لتر	٠,٢٥٥٧
بيروفات/١٠٠ مل		ميكرومول / لتر	١٧,١٠٤
أنسولين	نانوجرام /	نانومول / لتر	١٢,٨٧١
مل		مليمول / لتر	٠,٠٥٥٥
بروتين	جم / ١٠٠	ميكرومول / لتر	٩٦,٠٦٢
مل		مليمول / لتر	٠,١١١
بيروفات	مجم / ١٠٠	ميكرومول / لتر	٥٩,٤٨٥

من نظام قديم		إلى وحدات دولية	المعامل ×
حديد وقدره الارتباط للحديد	ميكروجرام / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٠,١٧٩
دهن براز	جم / ٢٤ ساعة	مليمول / ٢٤ ساعة	٣,٣٣٣
رصاص	ميكروجرام / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٠,٠٤٨٣
زنك	ميكروجرام / ١٠٠ مل	ميكرومول/لتر	٠,١٥٣
صوديوم	مجم / ١٠٠ مل	مليمول / لتر	٠,٤٣٥
فوسفور	مجم / ١٠٠ مل	مليمول / لتر	٠,٣٢٢٩
فوسفوليبيدات	مجم فوسفور / ١٠٠ مل	مليمول / لتر	٠,٣٢٢٩
فوسفوليبيدات	جم / لتر	مليمول / لتر	١,٢٩٢
ڤيتامين أ	ميكروجرام / ١٠٠ مل	ميكرومول/لتر ريتينول	٠,٠٣٤٩
		خلات ريتينيك	٠,٣٠٤
ڤيتامين ج	مجم / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٥٦,٧٧٦
كاروتين	ميكروجرام / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٠,٠١٨٦
كالسيوم بلازما	مجم / ١٠٠ مل	مليمول / لتر	٠,٢٤٩٥
كالسيوم بول	مجم / ٢٤ ساعة	مليمول / ٢٤ ساعة	٠,٠٤١٧
كرياتين	مجم / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٧٦,٢٥٤
كرياتينين بلازما	مجم / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٨٨,٤٠٢
كرياتينين بول	مجم / ٢٤ ساعة	ميكرومول / ٢٤ ساعة	٩,٠٩٠٩
كلوريد	مجم / ١٠٠ مل	مليمول / لتر	٠,٢٨٢
كورتيزول بلازما	ميكروجرام / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٣٦,٢٣١٩
كورتيزول بول	ميكروجرام / ٢٤ ساعة	نانومول/ ٢٤ ساعة	٢,٧٧٧٨
كوليستيرول	مجم /١٠٠ مل	مليمول / لتر	٠,٠٢٥٩
ماغنسيوم	مجم / ١٠٠ مل	مليمول / لتر	٠,٤١١٣
ميتهيموجلوبين	جم / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٦٢١,١٢
ميوجلوبين	مجم / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٠,٥٨٤٨
نحاس	ميكروجرام / ١٠٠ مل	ميكرومول / لتر	٠,١٥٧٤
هرمون سوماتوتروبين	نانوجرام / مل	بيكومول / لتر	٤٥,٤٥٤
هيموجلوبين	جم / ١٠٠ مل	مليمول / لتر	٠,٦٢٠٧
يوريا بلازما	مجم / ١٠٠ مل	مليمول / لتر	٠,١٦٦٥
يوريا بول	جم / ٢٤ ساعة	مليمول / ٢٤ ساعة	١٦,٦٦

٥ ـ أقطار الفتحات للمناخل

قطر فتحة المنخل (م)	عدد المش (Tyler) مش / بوصة (رقم المنخل)	مقياس أمريكي ASTM (رقم المنخل)	مقياس بريطاني BS مش / بوصة (رقم المنخل)
٠,٠٣٧	٤٠٠	٤٠٠	—
٠,٠٤٤	٣٢٥	٣٢٥	—
٠,٠٤٥	—	—	٣٥٠
٠,٠٥٣	٢٧٠	٢٧٠	٣٠٠
٠,٠٦٣	٢٥٠	٢٣٠	٢٤٠
٠,٠٧٤	٢٠٠	٢٠٠	—
٠,٠٧٥	—	—	٢٠٠
٠,٠٨٨	١٧٠	١٧٠	—
٠,٠٩٠	—	—	١٧٠
٠,١٠٥	١٥٠	١٤٠	١٥٠
٠,١٢٥	١١٥	١٢٠	١٢٠
٠,١٤٩	١٠٠	١٠٠	—
٠,١٥٠	—	—	١٠٠
٠,١٧٧	٨٠	٨٠	—
٠,١٨٠	—	—	٨٥
٠,٢١٠	٦٥	٧٠	٧٢
٠,٢٥٠	٦٠	٦٠	٦٠
٠,٢٩٧	٤٨	٥٠	—
٠,٣٠٠	—	—	٥٢
٠,٣٥٤	٤٢	٤٥	—
٠,٣٥٥	—	—	٤٤
٠,٤٢٠	٣٥	٤٠	٣٦

قطر فتحة المنخل (م)	عدد المش (Tyler) مش / بوصة (رقم المنخل)	مقياس أمريكي ASTM (رقم المنخل)	مقياس بريطاني BS مش / بوصة (رقم المنخل)
٠,٥٠٠	٣٢	٣٥	٣٠
٠,٥٩٥	٢٨	٣٠	—
٠,٦٠٠	—	—	٢٥
٠,٧٠٧	٢٤	٢٥	—
٠,٧١٠	—	—	٢٢
٠,٨٤١	٢٠	٢٠	—
١,٠٠٠	١٦	١٨	١٦
١,١٩	١٤	١٦	—
١,٢٠	—	—	١٤
١,٤١	١٢	١٤	—
١,٦٨	١٠	١٢	١٠
٢,٠٠	٩	١٠	٨

٦ ـ حيز الجسم التمثيلي للحيوانات المختلفة

وزن الجسم كجم	حيز الجسم التمثيلى كجم ٠,٧٥	وزن الجسم كجم	حيز الجسم التمثيلى كجم ٠,٧٥
٠,٠٥	٠,١٠٦	٠,١٠	٠,١٧٨
٠,٥٠	٠,٥٤٩	١,٠٠	١,٠٠٠
٢,٠٠	١,٦٨	٣,٠٠	٢,٢٨٠
٤,٠٠	٢,٨٣	٥,٠٠	٣,٣٥
٦,٠٠	٣,٨٤	٨,٠٠	٤,٧٥
١٠,٠٠	٥,٦٢	١٢,٠٠	٦,٤٤
١٥,٠٠	٧,٦٢	٢٠,٠٠	٩,٤٦
٢٥,٠٠	١١,٢٠	٣٠,٠٠	١٢,٨٠
٤٠,٠٠	١٥,٩٠	٥٠,٠٠	١٨,٨٠
٦٠,٠٠	٢١,٦	٧٠,٠٠	٢٤,١٠
٨٠,٠٠	٢٦,٧	١٠٠,٠٠	٣١,٦٠
١٢٠,٠٠	٣٦,٢	١٤٠,٠٠	٤٠,٧
١٦٠,٠٠	٤٤,٩	١٨٠,٠٠	٤٩,١
٢٠٠,٠٠	٥٣,٢	٢٥٠,٠٠	٦٢,٨
٣٠٠,٠٠	٧٢,١	٣٥٠,٠٠	٨٠,٩
٤٠٠,٠٠	٨٩,٤	٤٦٥,٠٠	١٠٠,٠٠
٥٠٠,٠٠	١٠٦,٠	٦٠٠,٠٠	١٢١,٠٠
٧٠٠,٠٠	١٣٦,٠٠	٨٠٠,٠٠	١٥٠,٠٠
٩٠٠,٠٠	١٦٤,٠٠	١٠٠٠,٠٠	١٧٨,٠٠
١١٠٠,٠٠	١٩١,٠٠	١٢٠٠,٠٠	٢٠٤,٠٠

٧ . حروف الهجاء المختلفة والأرقام :

ترتيب الحروف الأبجدية :

أ ـ ب ـ ج ـ د ـ هـ ـ و ـ ز ـ ح ـ ط ـ ى ـ ك ـ ل ـ م ـ ن ـ س ـ ع ـ ف ـ ص ـ ق ـ ر ـ ش ـ ت ـ ث ـ خ ـ ذ ـ ض ـ ظ ـ غ .

أ أ - أ ب ....

حروف الهجاء اليونانية :

ما يقابله فى اللغة الحديثة	منطوقه	الحرف اليونانى	
a	الفا	A	a
b	بيتا	B	ß
g, i[1]	جاما	T	γ
th[2]	ديلتا	Δ	δ
e	ابسيلون	E	ε
z	زيتا	Z	ζ
i	ايتا	H	η
th	ثيتا	θ	υ
i	يوتا	I	ι
k	كابا	K	χ
l	لامبدا	A	λ
m	ميو	M	μ
n	نيو	N	ν

١ ـ قبل i ، e .

٢ ـ كما فى الإنجليزية فى كلمة Father .

٣ ـ كما فى الإنجليزية فى كلمة Think.

الحرف اليونانى		منطوقه	ما يقابله فى اللغة الحديثة
ξ	Ε	زى	x
ο	Ο	اوميكرون	o[1]
π	Π	بى	p
e	Ρ	رو	r
σ	Σ	سيجما	s
τ	Τ	تاو	t
ϑ	Υ	ابسيلون	i
φ	Φ	فى	f
χ	Χ	شى	ch[2]
ψ	Ψ	بسى	ps
ω	Ω	اوميجا	o

١ـ كما فى نطق Loch (لوخ).

٢ ـ كما فى نطق Ich (إيش) .

الأرقام الرومانية:

الرقم الرومانى	مثيله بالعربى	الرقم الرومانى	مثيله بالعربى
I	١	C	١٠٠
II	٢	CC	٢٠٠
III	٣	CCC	٣٠٠
IV	٤	CD	٤٠٠
V	٥	D	٥٠٠
VI	٦	DC	٦٠٠
VII	٧	DCC	٧٠٠
VIII	٨	DCCLXVIII	٧٦٨
IX	٩	DCCC	٨٠٠
X	١٠	CM	٩٠٠
XV	١٥	CMXC	٩٩٠
XIX	١٩	M	١٠٠٠
XX	٢٠	MXCV	١٠٩٥
XXX	٣٠	MC	١١٠٠
XL	٤٠	MCC	١٢٠٠
L	٥٠	MCCC	١٣٠٠
LX	٦٠	MCD	١٤٠٠
LXX	٧٠	MD	١٥٠٠
LXXIX	٧٩	MDC	١٦٠٠
LXXX	٨٠	MDCC	١٧٠٠
XC	٩٠	MDCCC	١٨٠٠
XCIX	٩٩	MCMLX	١٩٦٠
		MM	٢٠٠٠
		–	٥٠٠٠
		–	١٠٠٠٠
		–	١٠٠٠٠٠
		M	١٠٠٠٠٠٠

مراجع الملاحق :

- عبد القادر راشد أبو عقادة ، مصطفى محمد أبو النجا (١٩٧٠) : طرق التحليل الغذائى – دار المعارف بالاسكندرية .

- Latner A.L.(1975) Clinical Biochemistry 7 th Ed. Saunders Philadelphia .

-Merck E. (1974)Klinisches Labor 12 Auflage Merck Darmstadt .

- Oser, B.L.(1979) Hawk's Physielogical Chemistry 14 th Ed. Tata Me Graw - Hill New Delhi .

- Ranganna S. (1979) Maual of analysis of Fruit and vegetable Products .Tata Me Graw - Hill New Delhi .

- Schmidl , M. (1981) Laborunter Suchungen - Veterinar medizin Boehringer Mannheim .

- Zilva J.F. & Pannall . P.R. (1983) Clinical Chemistry 3rd Lloyd - Luke , London .

المحتـــويـــات

الموضوع | الصفحة

الباب الثانى : التحليل النباتى والنوعى والحسى

الموضوع	الصفحة

الموضوع	الصفحة

الباب الثالث
التحليل الكمى الكيماوى
والطبيعى - كيماوى

الموضوع	الصفحة

الموضوع	الصفحة

الموضوع	الصفحة

الموضوع	الصفحة

الموضوع	الصفحة

الموضوع	الصفحة

الموضوع	الصفحة

الموضوع	الصفحة

الباب الرابع
التحليل الميكروبيولوچى

الموضوع	الصفحة

الباب الخامس

التحليل البيولوجى

ظهر للمؤلف كذلك الكتب التالية :

١ – رعاية حيوانات المزرعة ـ دار النشر للجامعات المصرية ـ مكتبة الوفاء (١٩٩١) .

٢ – رعاية الكلاب ـ مكتبة مدبولى (١٩٩١) .

٣ – الأسس العلمية لإنتاج الأسماك ورعايتها – دار النشر للجامعات المصرية – مكتبة الوفاء (١٩٩٤) .

تحت الطبع :

٤ – الفطريات السامة والسموم الفطرية ـ دار النشر للجامعات